PENGARUH KOMBINASI EXOSOME, GLUTATION DAN VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI GEN IFN-γ DAN CD68

(Studi Eksperimental *in Vivo* pada kulit mencit C57BL model hiperpigmentasi)

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2

Widiah Indra Arsanti

MBK 222010337

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG 2025

TESIS
PENGARUH KOMBINASI EXOSOME, GLUTATION DAN VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI GEN IFN-γ DAN CD68

(Studi Eksperimental *in Vivo* pada kulit mencit C57BL model hiperpigmentasi)

Disusun oleh

Widiah Indra Arsanti

(MBK 222010337)

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji
Januari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima
Menyetujui.

Pembimbing I	Pembimbing II
Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med	dr. Mas Rizky AA Syamsunarno, M. Kes., Ph.D
NIDN.0607067102	NIDN.0001128204

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

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

NIK 210 113 160

PERNYATAAN

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

Semarang, 2 Februari 2025

(Widiah Indra Arsanti)

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamuallaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

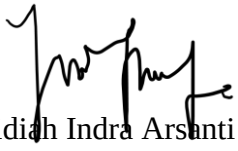
Alhamdulillah penulis ucapkan rasa syukur kepada ALLAH SWT atas rahmat dan berkat-Nya, sehingga tesis dengan judul, "PENGARUH KOMBINASI EXOSOME, GLUTATION DAN VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI GEN IFN-γ DAN CD68 (Studi Eksperimental *in Vivo* pada kulit mencit C57BL model hiperpigmentasi)" ini dapat terselesaikan. Shalawat dan salam kami sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW, yang selalu menjadi pedoman kami. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum, Rektor Universitas Islam Sultan Agung, dan seluruh wakil rektor atas kesempatan untuk mengejar dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp. KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B., FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si. Med sebagai pembimbing I yang telah memberikan banyak masukan kepada penulis.
5. dr. Mas Rizky AA Syamsunarno, M. Kes., Ph. D sebagai dosen pembimbing II yang sangat baik dan selalu sabar memberikan petunjuk dan selalu mengarahkan penulis hingga terselesaikan tesis ini.
6. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M. Kes, Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp. KF, dan Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes sebagai penguji I, II, dan III yang telah banyak memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini menjadi lebih baik.

7. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
8. Orang tua penulis yang selalu memberikan support dan doa sehingga tesis ini bisa diselesaikan.
9. Suami tercinta dr. Ficky Fajar Sahdiniar, Sp.OT terimakasih untuk selalu ada dan mendukung. Serta anak kebanggaan bunda: Fahim dan Diza, karena dukungan kalian lah, bunda bisa berjuang sejauh ini, semoga kelak kalian bisa meraih cita- cita lebih dari yang bunda sudah capai saat ini.
10. Seluruh keluarga di Malang dan di Gresik yang selalu memberikan doanya terimakasih.
11. Segenap staff SCCR (*Stem Cell Cancer Research*) terima kasih banyak atas semua arahannya dan selalu mau direpotin terus.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terima kasih atas dukungannya.

Penulis dengan tulus meminta maaf yang sebesar besarnya apabila selama ini dalam menjalani pendidikan dan dalam penyusunan tesis ini terdapat kesalahan, baik yang penulis sadari maupun tidak sadari. Penulis berharap biarpun ada kekurangan dalan penulisan tesis ini, semoga dapat memberikan manfaat bagi diri penulis, dan bagi Program Pendidikan Magister Ilmu Biomedis, dan pihak yang berkepentingan. Semoga Allah SWT terus memberikan berkah dan rahmatnya kepada kita semua, Aamiin Aamiin Ya Rabbal Alamin.

Malang, Februari 2025



Widiah Indra Arsanti

ABSTRAK

Latar Belakang: Radiasi sinar UVB merupakan faktor utama penyebab hiperpigmentasi, Ditandai dengan pigmen berwarna hitam pada kulit akibat meningkatnya jumlah melanin, Jika proses berlangsung secara kronis sitokin inflamasi seperti IFN-γ dan CD68 akan terekspresi. penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC), glutation dan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada jaringan kulit yang mengalami hiperpigmentasi.
Metode: Penelitian eksperimen dengan post test only control group design menggunakan subjek mencit dibagi menjadi 5 kelompok yaitu K1 mencit sehat, K2 Mencit hanya dipapar UVB, K3 mencit dipapar UVB dan diinjeksi glutathion dan vitamin C, K4 mencit dipapar UVB dan diinjeksi exosome, dan K5 mencit dipapar UVB dan diinjeksi exosome dan glutathion serta vitamin C. Ekspresi IFN-γ dan CD68 dianalisis dengan metode RTq-PCR, kemudian hasil dilakukan uji *Oneway Anova* untuk Ekspresi IFN-γ dan uji *Kruskal Wallis* untuk ekspresi CD68.
Hasil: Rata rata ekspresi gen IFN-γ paling tinggi pada kelompok K2 1,28±0,64, pada kelompok K3 0,56 ± 0,33, kelompok K4 0,54 ± 0,28, dan paling rendah K5 0,42 ± 0,19. Terdapat perbedaan signifikan ekspresi gen IFN-γ diantara semua kelompok dengan uji *Oneway Anova* p=0,001 ($p<0,05$). Rata rata ekspresi gen CD68 paling tinggi pada kelompok K2 1,32± 0,38, kelompok K3 0,63±0,34, K4 0,51±0,19, dan K5 paling rendah 0,50±0,13. Terdapat perbedaan signifikan ekspresi gen IFN-γ diantara semua kelompok dengan uji *Kruskal Wallis* p=0,001 ($p<0,05$). Analisis kombinasi injeksi EH-MSC dan glutation dengan vitamin C lebih rendah terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada jaringan kulit yang mengalami hiperpigmentasi.
Kesimpulan: pemberian EH-MSC dan glutathione dengan vitamin C berpengaruh terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada jaringan kulit yang mengalami hiperpigmentasi.

Kata Kunci: Ekspresi IFN-γ, CD68, EH-MSC, hiperpigmentasi.

ABSTRACT

Background: UVB radiation is the main factor causing hyperpigmentation, characterized by black pigment on the skin due to increased melanin, if the process takes place chronically inflammatory cytokines such as IFN-γ and CD68 will be expressed. This study aims to determine the effect of the combination of *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC), glutathione and vitamin C on the expression of the IFN-γ and CD68 genes in skin tissue experiencing hyperpigmentation.

Method: Experimental research with post test only control group design using mice subjects divided into 5 groups, namely K1 healthy mice, K2 mice only exposed to UVB, K3 mice exposed to UVB and injected with glutathione and vitamin C, K4 mice exposed to UVB and injected with exosome, and K5 mice exposed to UVB and injected with exosome and glutathione and vitamin C. IFN-γ and CD68 expression were analyzed using the RTq-PCR method, then the results were tested with *Oneway Anova* for IFN-γ expression and *Kruskal Wallis* test for CD68 expression

Results: The average IFN-γ gene expression was highest in group K2 1.28±0.64, in group K3 0.56±0.33, group K4 0.54±0.28, and the lowest in K5 0.42±0.19. There was a significant difference in IFN-γ gene expression between all groups with *Oneway Anova* test $p=0.001$ ($p<0.05$). The average CD68 gene expression was highest in group K2 1.32±0.38, group K3 0.63±0.34, K4 0.51±0.19, and the lowest in K5 0.50±0.13. There was a significant difference in IFN-γ gene expression between all groups with *Kruskal Wallis* test $p=0.001$ ($p<0.05$). Analysis of the combination of EH-MSC injection and glutathione with vitamin C showed a lower effect on IFN-γ and CD68 gene expression in hyperpigmented skin tissue.

Conclusion: administration of EH-MSC and glutathione with vitamin C affects the expression of IFN-γ and CD68 genes in skin tissue experiencing hyperpigmentation.

Keywords: IFN-γ expression, CD68, EH-MSC, hyperpigmentation.

DAFTAR ISI

PERNYATAAN iii
RIWAYAT HIDUP iv
KATA PENGANTAR v
ABSTRAK vii
ABSTRACT viii
DAFTAR ISI ix
DAFTAR TABEL xiii
DAFTAR GAMBAR xiv
DAFTAR SINGKATAN xv
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1. Latar Belakang 1
1.2. Rumusan Penelitian 4
1.3. Tujuan Penelitian 4
1.3.1. Umum 4
1.3.2. Khusus 4
1.4. Manfaat Penelitian 5
1.4.1. Teoritis 5
1.4.2. Praktis 5
1.5. Originalitas Penelitian 5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 8
2.1. Interferon Gama 8
2.2. CD68 9
2.2.1 Faktor yang mempengaruhi ekspresi IFN-γ dan CD68 pada kulit 11
2.3. Hiperpigmentasi 13
2.4. MSCs 15

2.4.1. Fungsi 15
2.4.2. Mobilisasi MSC 16
2.4.3. Konsep Small Molecule Growth Factor MSC 17
2.4.4. Induksi Small Molecule dan Exosome MSC 18
2.4.5 *Exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC).....19
2.5. Injeksi Glutahione dan Vitamin C 25
2.5.1 Mekanisme kerja Glutatione mereduksi ROS 27
2.5.2 Mekanisme kerja Vitamin C menurunkan ROS 30
2.6. Pengaruh exosome dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen Interferon Gama dan CD68 36
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS 39
3.1. Kerangka Teori 39
3.2. Kerangka Konsep 42
3.3. Hipotesis 42
BAB IV METODE PENELITIAN 43
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....43
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional 44
4.2.1. Variabel Penelitian.....44
4.2.2. Definisi Operasional 44
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian 46
4.3.1. Subjek Penelitian 46
4.3.2. Sampel Penelitian 46
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian 47
4.3.4. Besar Sampel 47
4.4. Alat dan Bahan 48
4.4.1. Alat 48
4.4.2. Bahan 48
4.5. Cara Penelitian.....48
4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance* 48

4.5.2. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord* 49
4.5.3. Penetapan Dosis 50
4.5.4. Paparan UV-B 51
4.5.5. Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Jaringan 52
4.5.6. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA 52
4.5.7. Metode validasi pewarnaan *Masson Fontana* 54
4.5.8 Pembacaan IFN-γ dan CD68 dengan Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 55
4.6. Tempat dan Waktu Peneltian 56
4.7. Analisa Data 56
4.8. Alur Penelitian 57
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN 58
5.1 HASIL PENELITIAN 58
5.1.1 Hasil validasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSCs) 58
5.1.2 Validasi pada jaringan kulit mencit C57BL model hiperpigmentasi 61
5.1.3 Efek injeksi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 62
5.2 PEMBAHASAN 66
BAB VI KESIMPULAN 72
6.1 Kesimpulan 72
6.2 Saran 72
DAFTAR PUSTAKA 74
LAMPIRAN 82
Lampiran 1. *Ethical Clearance* 82
Lampiran 2. Hasil Analisis 83
Lampiran 3. Statistik ekspresi gen IFN-γ dan CD68 86

Lampiran 3. Lampiran dokumentasi penelitian 92

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian..... 5

Tabel 5.1 Data hasil analisis statistik ekspresi gen IFN-γ dan CD68..... 62

Tabel 5.2 Uji Post Hoc Temhane ekspresi IFN-γ pada tiap kelompok..... 64

Tabel 5.3 Uji Mann-Whitney CD68 pada masing-masing kelompok 66

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme terjadinya hiperpigmentasi akibat paparan UV. 14

Gambar 2.3 Mekanisme kerja antioksidan asam askorbat. 33

Gambar 3.1. Kerangka Teori..... 41

Gambar 3.2. Kerangka Konsep 42

Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian..... 43

Gambar 4.2 Alur Penelitian..... 57

Gambar 5.1 hasil kultur MSCs sel berbentuk spindle-like dengan pembesaran 100x..... 59

Gambar 5.2 Analisis Flow cytrometry terhadap ekspresi CD90.1 , CD29, CD45 dan CD31 59

Gambar 5.3 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit (kiri) dan (kanan) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red* pada pembesaran 100x (ditunjukan dengan panah orange)..... 60

Gambar 5.4 Validasi jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi 61

Gambar 5.5 Grafik Ekspresi gen IFN-γ pada tiap kelompok penelitian..... 64

Gambar 5.6 Grafik Ekspresi gen CD68 pada tiap kelompok perlakuan..... 65

DAFTAR SINGKATAN

AA	: *Asam Askorbat*
AP-1	: *Activator protein 1*
CAT	: *Catalase*
cAMP	: *Cyclic adenosida monofosfat*
CD	: *Cluster Of Differntiation*
EPO	: *Erythrooietin*
EH-MSCs	: *Exosome hypoxia mesenchymal stem cells*
GSH	: Glutation
GCSF	: *Granulocyte colony stimulating factor*
HLA-DR	: *Human leukocyt antigens- isotipe DR*
IFN-Y	: *Interferon gamma*
MAPK	: *Mitogen activated protein kinase*
MED	: *Minimal erythema dose*
MMP	: *Matrix metalloproteinase*
NF-kβ	: *Nuclear factor-kappa β*
Nrf2	: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
PIGF	: *Placental growth factor*
ROS	: *Reactive oxygen species*
SDF- 1	: *Stromal-derived factor-1*
STAT3	: *Signal transducer and activator of transcription 3*
SIRT	: *Sirtuin*
SCF	: *Stem cell factor*
SOD	: *Superoksida dismutase*
TNF α	: *Tumor necrosis factor α*
UVB	: *Ultraviolet B*
VEGF	: *Vascular endothelial growth factor*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radiasi sinar ultraviolet B (UVB) merupakan faktor utama penyebab hiperpigmentasi,[1] Ditandai dengan pigmen berwarna hitam pada kulit akibat meningkatnya jumlah melanin.[1,2] Mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor-kappa* B (NF-kβ) yang berperan dalam proses inflamasi. Jika proses berlangsung secara kronis sitokin inflamasi seperti IFN-γ dan CD68 akan terekspresi.[3,4] Pengobatan dengan beberapa agen kimiawi seperti arbutin, asam azelaic, asam kojic, dan hidrokuinon merupakan pilihan utama untuk mencegah atau mengobati hiperpigmentasi.[2,5] Dilaporkan bahwa agen kimia tersebut menimbulkan efek samping yang merugikan seperti genotoksisitas, iritasi kulit, dermatitis kontak, dan kanker kulit.[5] *Exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) yang diketahui memiliki efisiensi penetrasi kulit yang tinggi, dapat memberikan manfaat kuratifnya melalui banyak mekanisme terapi yang berbeda secara bersamaan, sehingga menghasilkan efek biologis yang lebih baik dibandingkan senyawa molekul kecil.[6] Mekanisme yang mendasari aktivitas exosome terhadap hiperpigmentasi hingga saat ini masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Prevalensi hiperpigmentasi di Indonesia cukup tinggi karena mayoritas penduduknya memiliki jenis kulit yang termasuk dalam kategori Fitzpatrick V dan VI. Sebuah penelitian di Departemen Dermatologi dan Venereologi Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo (RSCM) Jakarta pada tahun 2014 menunjukkan bahwa pasien dengan kelainan hiperpigmentasi mencapai 33,6% dari total 4.559

kunjungan, dengan melasma mencapai 53,45% dari seluruh kelainan hiperpigmentasi. Penelitian lain di Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya pada tahun 2014 menunjukkan bahwa jumlah pasien melasma baru sebanyak 1.313 pasien atau 14,1% dari seluruh pasien di Divisi Kosmetik Medis Unit Rawat Jalan Dermatologi dan Venereologi Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya.[7] Perkiraan prevalensi melasma di Indonesia sekitar 4% dari seluruh kasus penyakit kulit. Prevalensi melasma di Asia Tenggara dilaporkan mencapai 40% pada wanita dan 20% pada pria. Studi di Australia menunjukkan bahwa sekitar 72% pria dan 42% wanita di bawah usia 30 tahun, serta sekitar 98% pria dan 92% wanita pada usia 50 tahun mengalami gejala photoaging.[3,4] Kasus hiperpigmentasi terus meningkat, dengan lebih dari 100.350 kasus baru dan 6.850 kasus kematian karena perkembangan menjadi kanker kulit. Dilaporkan sekitar 80% penuaan kulit pada wajah dapat dikaitkan dengan paparan sinar UV.[8]

ROS yang berlebihan memicu perjalanan sinyal dan aktivasi faktor transkripsi *nuclear factor-kappa B* (NF-kβ), yang berperan dalam mengatur respons inflamasi, meningkatkan sitokin inflamasi, peningkatan ini tidak hanya mempengaruhi produksi melanin, tetapi juga menghambat sintesis kolagen dan menyebabkan proses inflamasi yang memainkan peran kunci dalam terjadinya hiperpigmentasi.[5] Terapi injeksi juga dilakukan untuk mencegah dan mengobati hiperpigmentasi, diantaranya injeksi Glutathione dan Vitamin C. Glutathione, sebagai antioksidan kuat, memainkan peran penting dalam menetralkan radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif dalam sel kulit. Hal ini dicapai melalui jalur glutation-*S-transferase* (GST), yang mengurangi produksi melanin dengan

mengubah *eumelanin* (pigmen gelap) menjadi *pheomelanin* (pigmen terang).[9] Selain itu, Glutathione dapat menghambat enzim tirosinase, yang merupakan kunci dalam proses melanogenesis, sehingga mengurangi produksi melanin yang berlebihan dan membantu mencerahkan kulit yang hiperpigmentasi.[10] Sedangkan Vitamin C merupakan vitamin yang larut dalam air yang juga dikenal dengan asam askorbat, bekerja sinergis dengan Glutathione melalui beberapa mekanisme.[9,10]

Vitamin C berinteraksi dengan ion tembaga di situs aktif tirosinase dan mengurangi konversi *L-3,4-dihydroxyphenylalanine* (L-DOPA) menjadi *dopaquinone* (DQ) dengan memblokir *dihydrochinindol-2-carboxyl acid*. Asam askorbat mereduksi DQ kembali ke L-DOPA dan mengurangi DQ teroksidasi sehingga mencegah pembentukan melanin. Vitamin C meningkatkan kadar Glutathione dalam tubuh dan menetralkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada kulit.[10] Lebih lanjut, Vitamin C berperan dalam regenerasi dan perbaikan kulit dengan merangsang sintesis kolagen, yang membantu memperbaiki tekstur kulit dan mencerahkan noda hitam.[10] Glutathione dan Vitamin C masing-masing berperan dalam menurunkan produksi melanin, keduanya tergolong sebagai antioksidan. Namun, studi mengenai pengaruh dan cara penggunaan Glutathione serta Vitamin C dalam pengobatan hiperpigmentasi masih terbatas dan hasilnya kontroversial. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana respons hiperpigmentasi terhadap terapi Exosome, yang bekerja melalui jalur berbeda dari antioksidan dalam menurunkan inflamasi pada hiperpigmentasi. Exosome dapat mempercepat terjadinya proses penyembuhan luka. Exosome memiliki komposisi berbagai macam materi genetik, termasuk RNA

seperti mRNA, miRNA, dan lncRNA, serta protein, lipid, dan faktor bioaktif lainnya.[9] Dalam konteks hiperpigmentasi, Exosome dapat mengirimkan sinyal yang mempengaruhi proliferasi, diferensiasi, dan migrasi melanosit, yang pada gilirannya dapat mengatur produksi melanin dan menyebabkan perubahan warna kulit.[11]

Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti akan melakukan penelitian dengan tujuan mengetahui pengaruh kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC), Glutathione dan Vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.2. Rumusan Penelitian

Apakah terdapat pengaruh kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC), glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.3.2. Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutathione dan vitamin C terhadap

ekspresi gen IFN-γ pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

2. Untuk mengetahui pengaruh kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.4.2. Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC), glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
Wang XY, Guan XH, Yu ZP, Wu J, Huang QM, Deng	Human amniotic stem cells-derived exosmal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and	*In Vivo* Eksperimental	miR-181a-5p dan miR-199a yang berasal dari eksosom hASCs menghambat melanogenesis dengan menekan MITF

KY, Xin HB, 2021	promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively		
Jung Min Lee, Jung Ok Lee, Yujin Kim, You Na Jang, A. Yeon Park, Su-Young Kim, Hye Sung Han, 2023	Anti-melanogenic effect of exosomes derived from human dermal fibroblasts (BJ-5ta-Ex) in C57BL/6 mice and B16F10 melanoma cells	*In Vitro* Eksperimental	Pengobatan dengan BJ-5ta-Ex meningkatkan kecerahan jaringan dan mengurangi distribusi melanosom.
Lu W, Zhang J, Wu Y, Sun W, Jiang Z, Luo X., 2023	Engineered NF-κB siRNA-encapsulating exosomes as a modality for therapy of skin lesions.	*In Vitro* Eksperimental	Ketika tikus dengan lesi kulit diolesi dengan si-ADMSC-EXOs, perbaikan kulit yang terkena lesi menjadi lebih cepat dan ekspresi sitokin inflamasi menurun.
Liquan Wang a, Tianhao Li a, Xuda Ma a, Yunzhu Li a, Zhujun Li a, Ziming Li a, 2023	Exosomes from human adipose–derived mesenchymal stem cells attenuate localized scleroderma fibrosis by the let-7a-5p/TGF-βR1/Smad axis	*In Vivo* dan *In Vitro* Eksperimental	ADSC-Exo yang terverifikasi membatasi proliferasi dan migrasi LSF
Cita Rosita Sigit Prakoeswa, Febrina Dewi Pratiwi, Nanny Herwanto, Irmadita Citrashanty, Diah	The effects of amniotic membrane stem cell-conditioned medium on hiperpigmentasi	*Clinical study*, Eksperimental	amniotic membrane stem cell-conditioned medium memperbaiki kondisi hiperpigmentasi pada 24 subjek wanita

Mira Indramaya , Dwi Murtiastutik, Hari Sukanto, Fedik A Rantam, 2019

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
UNISSULA
جامعة سلطان أجونج الإسلامية

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interferon Gama

Interferon-gamma (IFN-γ) adalah sitokin penting yang berperan dalam respon imun dan inflamasi, yang juga terlibat dalam proses hiperpigmentasi kulit. IFN-γ diproduksi oleh berbagai sel imun, termasuk sel T dan sel natural killer (NK), sebagai respon terhadap infeksi dan stres.[12] Pada paparan UVB, sel-sel kulit mengalami kerusakan DNA dan peningkatan produksi *Reactive oxygen species* (ROS), yang memicu respon inflamasi. IFN-γ berperan dalam memperkuat respon in dengan mengaktivasi berbagai sel imun dan merangsang produksi sitokin lainnya.[13] Dalam konteks hiperpigmentasi, IFN-γ memiliki beberapa mekanisme yang dapat mempengaruhi produksi melanin.[13] Pertama, IFN-γ dapat mempengaruhi aktivitas melanosit, yaitu sel yang memproduksi melanin. IFN-γ meningkatkan ekspresi enzim tirosinase, yang merupakan enzim kunci dalam jalur biosintesis melanin. Peningkatan aktivitas tirosinase akan meningkatkan produksi melanin, yang menyebabkan penggelapan kulit atau hiperpigmentasi. Selain itu, IFN-γ dapat mempengaruhi sel-sel lain dalam kulit seperti keratinosit dan fibroblas, yang juga berkontribusi pada proses inflamasi dan remodeling kulit. IFN-γ merangsang ekspresi molekul adhesi sel dan kemokin yang merekrut lebih banyak sel imun ke area yang terpapar, memperkuat respon inflamasi lokal. Inflamasi kronis ini dapat memperburuk hiperpigmentasi karena produksi melanin yang terus menerus sebagai mekanisme pertahanan kulit.[14]

Jalur sinyal utama yang terlibat dalam aksi IFN-γ adalah melalui reseptor IFN-γ yang mengaktifkan jalur JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*).[15] Aktivasi reseptor IFN-γ oleh IFN-γ memicu dimerisasi dan aktivasi JAK1 dan JAK2, yang kemudian memfosforilasi STAT1. STAT1 yang difosforilasi dimer dan translocates ke nukleus, di mana ia mengikat elemen respons IFN-γ pada DNA dan menginduksi transkripsi gen target yang terlibat dalam respon imun dan inflamasi.[16]

Pengaruh IFN-γ pada hiperpigmentasi juga dapat diperparah oleh interaksi dengan jalur sinyal lain, seperti NF-κB, yang diaktifkan oleh stres oksidatif dan inflamasi. Jalur NF-κB dapat meningkatkan ekspresi gen inflamasi dan enzim tirosinase, yang bersama-sama dengan jalur JAK-STAT, memperkuat efek IFN-γ pada hiperpigmentasi. Secara keseluruhan, IFN-γ memainkan peran ganda dalam merespon kerusakan kulit akibat UVB melalui peningkatan respon imun dan inflamasi serta stimulasi produksi melanin.[17] Pemahaman yang lebih baik mengenai mekanisme ini dapat membantu dalam pengembangan terapi yang lebih efektif untuk mengatasi hiperpigmentasi, terutama yang disebabkan oleh inflamasi kronis dan paparan sinar UV.[18]

2.2. CD68

CD68 adalah marker yang digunakan untuk mengidentifikasi makrofag, yaitu sel-sel imun yang berperan penting dalam inflamasi dan respon imun.[19] Makrofag yang mengeluarkan CD68 berpartisipasi dalam berbagai proses

fisiologis dan patologis, termasuk inflamasi kulit yang dapat menyebabkan hiperpigmentasi.[20] Paparan sinar UVB yang berlebihan dapat menginduksi kerusakan pada DNA sel kulit dan meningkatkan produksi *Reactive oxygen species* (ROS), yang pada gilirannya memicu aktivasi makrofag. Ketika makrofag diaktifkan, mereka mengeluarkan berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan yang dapat mempengaruhi sel-sel lain di kulit, termasuk melanosit.[20] Salah satu fungsi utama makrofag dalam konteks inflamasi adalah fagositosis, di mana mereka mengeliminasi sel-sel yang rusak dan patogen.[21] Dalam proses ini, makrofag melepaskan mediator inflamasi seperti *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-α) dan *interleukin-1 beta* (IL-1β), yang dapat meningkatkan inflamasi lokal dan mengaktifkan jalur sinyal yang terkait dengan respon inflamasi, seperti jalur NF-κB.[4] Aktivasi jalur NF-κB di makrofag dan sel-sel kulit lainnya mengarah pada peningkatan ekspresi gen-gen inflamasi, termasuk IFN-γ.[22] IFN-γ selanjutnya meningkatkan aktivitas makrofag dan merangsang produksi lebih banyak sitokin inflamasi, menciptakan loop umpan balik positif yang memperkuat inflamasi.[22] Inflamasi kronis ini memicu peningkatan aktivitas melanosit, yang merespons dengan memproduksi lebih banyak melanin untuk melindungi sel-sel dari kerusakan lebih lanjut, yang mengarah pada hiperpigmentasi.[23] Selain itu, makrofag yang diaktifkan dapat melepaskan enzim *matriks metalloproteinase* (MMP) yang memecah matriks ekstraseluler, menyebabkan perubahan struktural pada kulit yang dapat mempengaruhi distribusi melanin dan memperburuk hiperpigmentasi.[24]

Pada tingkat molekuler, CD68 di makrofag terlibat dalam jalur pensinyalan yang penting untuk fagositosis dan pemrosesan antigen. CD68 adalah protein membran yang terkait dengan lisosom dan berperan dalam perjalanan makrofag ke area inflamasi dan lesi. Aktivasi makrofag yang diekspresikan oleh CD68 menandakan proses inflamasi aktif yang dapat mempengaruhi berbagai jenis sel di kulit dan jaringan sekitarnya.[25]

Secara keseluruhan, CD68 menandai aktivitas makrofag dalam kulit yang terpapar UVB dan terlibat dalam proses inflamasi yang memicu hiperpigmentasi.[26] Pemahaman mendalam tentang peran CD68 dan makrofag dalam inflamasi kulit dapat membantu mengembangkan strategi terapeutik untuk mengatasi hiperpigmentasi yang disebabkan oleh inflamasi kronis dan kerusakan UVB.[27] Penelitian yang berfokus pada modulasi aktivitas makrofag dan ekspresi CD68 dapat membuka jalan bagi perawatan yang lebih efektif untuk kondisi kulit yang terkait dengan hiperpigmentasi.[27]

2.2.1 Faktor yang mempengaruhi ekspresi IFN-γ dan CD68 pada kulit

Kulit menyediakan lebih dari sekadar penghalang mekanis sederhana terhadap agresor eksternal, kulit merupakan susunan sel dan molekul efektor yang membentuk sistem imun kulit, Ada banyak jenis sel yang berkontribusi terhadap fungsi imun kulit. Diperkirakan terdapat 20 miliar limfosit di lapisan kulit, yang mungkin menjelaskan peran penting sel-sel ini dalam berbagai patologi. Di epidermis, populasi sel imun yang dominan diwakili oleh sel Langerhans dan sel T memori CD8+ yang bermukim di jaringan, dan di dermis, terdapat sel dendritik, makrofag, sel

limfoid bawaan, sel pembunuh alami, dan sel T memori CD8+ yang bermukim di jaringan. Sel T memori tampaknya memainkan peran penting dalam patogenesis penyakit kulit inflamasi.[28]

Stres oksidatif merupakan mekanisme yang diduga kuat sebagai penyebab utama penuaan kulit. Penuaan kulit merupakan proses kompleks yang melibatkan faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik yang berperan adalah genetik, metabolisme sel, dan perubahan hormonal. Selain itu, terdapat faktor ekstrinsik seperti radiasi ultraviolet, inframerah, dan karsinogen lingkungan yang turut berperan pada penuaan kulit.[29,30] Pada penuaan kulit secara instrinsik, lapisan epidermis menipis sehingga daerah kontak permukaan dermis dan epidermis menipis dan pertukaran nutrisi ke epidermis berkurang. Akibatnya kulit mudah lecet dan robek setelah trauma ringan. Kemampuan proliferasi sel basal semakin menurun. Di lapisan dermis, jumlah sel mast dan fibroblas lebih sedikit dibandingkan di kulit muda dan hal tersebut juga terjadi pada serat kolagen serta serat elastin.[30]

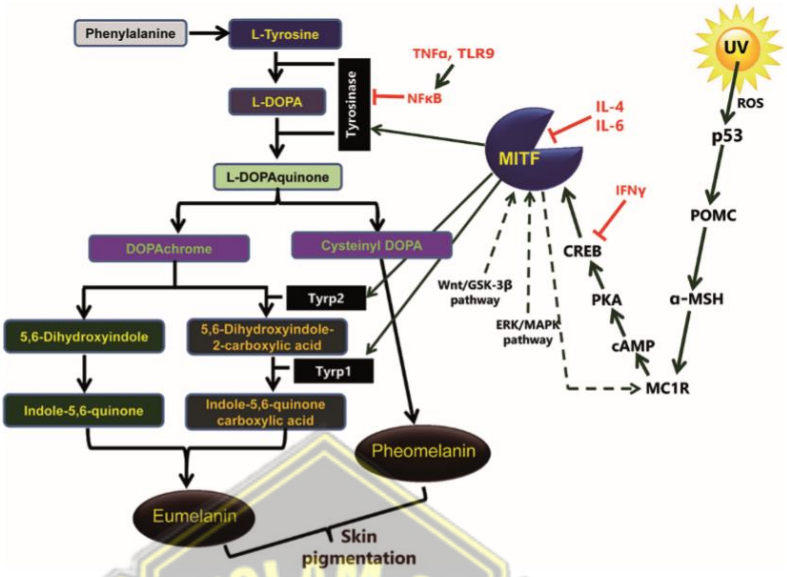
Terdapat dua faktor yang berperan dalam terjadinya penuaan kulit, yaitu faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik adalah genetik, metabolisme sel, dan perubahan hormonal. Selain itu, terdapat faktor ekstrinsik seperti radiasi ultraviolet, inframerah, dan karsinogen lingkungan yang turut berperan pada penuaan kulit.[29] Terdapat korelasi yang kuat antara peningkatan kadar biomarker inflamasi dan patologi berbagai penyakit kulit. Adanya faktor perancu tertentu seperti usia, jenis

kelamin, status sosial-ekonomi, indeks massa tubuh, pengobatan dan penggunaan narkoba lainnya, dan penyakit medis, serta ketidakkonsistenan dalam praktik metodologi seperti pengumpulan sampel, pengujian, dan pembersihan dan transformasi data, dapat berkontribusi terhadap variasi hasil.[31]

2.3. Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi adalah kondisi penuaan dini pada kulit yang disebabkan oleh paparan berulang oleh radiasi UVB, terutama dari matahari tetapi juga dapat disebabkan oleh sumber UVB buatan. Photoaging berbeda dari penuaan intrisnik dimana efek merusak dari sinar UVB mengubah struktur kulit normal secara cepat dan signifikan.[32] Hiperpigmentasi terjadi akibat kulit terpapar sinar UV-B secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu. Pejanan kronis sinar UV-B menyebabkan terjadinya *photoaging* dan *photocarcinogenesis.*[33] Kerusakan kulit terjadi pada komponen epidermis, dermis maupun jaringan *appendages* kulit. Perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit berupa meningkatnya jumlah melanin.[34]

Penyebab utama kerusakan manifestasi penuaan kulit berupa hiperpigmentasi. Pigmentasi kulit disebabkan karena meningkatnya kadar melanin yang signifikan akibat paparan dari luar.[33]



Gambar 2.1 Mekanisme terjadinya hiperpigmentasi akibat paparan UV.[35]

Paparn UV-B menginduksi melanogenesis melalui p53 memicu peningkatan ekspresi POMC untuk mensekresikan α-MSH yang mengatur ekspresi MITF, selanjutnya memicu enzim tyrosinase, Tyrp1 dan Tyrp2. Selain itu, radiasi UV-B meningkatkan produksi *Reactive oxygen species* (ROS) dalam sel keratin dan melanosit, dan pad konsentrasi tinggi ROS menyebabkankeru akan DNA, mengaktifkan p53 lebih lanjut, dan dengan demikian memicu melanogenesis. Melanosit adalah faktor aktif dalam siste imun kulit, memainkan peran penting dalam respons imun, dan memiliki sifato modulasi imun. TNF-α menghambat melanogenesis terutama melalui NF-KB dan mengurangi waktu paruh tyrosinase.[35]

2.4. MSCs

Mesenchymal stem cells (MSCs) memiliki kemampuan untuk memperbarui diri sendiri dan dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel jaringan seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit. MSC dapat diisolasi dari berbagai jaringan termasuk sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat.[36] MSC ditandai dengan ekspresi penanda permukaan CD seperti CD44+, CD73+, CD90+, dan CD105+, dan dibedakan dari sel hematopoietik yang tidak mengekspresikan CD34, CD45, CD14, dan HLA-DR. MSC memiliki potensi terapeutik yang besar karena kemampuannya untuk modulasi imun, perbaikan, dan regenerasi melalui mekanisme sinyal parakrin.[37]

2.4.1. Fungsi

Mesenchymal stem cells (MSC) memainkan peran vital dalam regenerasi jaringan karena kemampuannya untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi serta memproduksi faktor pertumbuhan dan sitokin. Stem cell berkomunikasi secara parakrin dan autokrin melalui sitokin yang mereka hasilkan.[38] Dalam komunikasi parakrin, stem cell menstimulasi aktivasi sel lain selama proses penyembuhan. Selain itu, kemampuan homing memungkinkan stem cell untuk mencapai organ target sebagai langkah awal sebelum menempel, berkembang biak, dan berdiferensiasi menjadi sel yang diperlukan.[36] Kemampuan MSC untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel menjadikannya sangat menarik untuk penggunaan klinis.[39] Penelitian menunjukkan

bahwa MSC terlibat dalam pemulihan dan regenerasi berbagai jenis kerusakan jaringan, seperti:

1. Penyakit neurodegeneratif termasuk stroke, Parkinson, Alzheimer, dan Huntington.
2. Masalah kardiovaskular seperti infark miokard dan iskemia vaskular perifer.
3. Gangguan hormonal seperti diabetes mellitus.
4. Penyakit autoimun.
5. Kondisi muskuloskeletal seperti fraktur, osteoporosis, dan osteoartritis.
6. Luka kulit kronis dan ulkus kornea.

2.4.2. Mobilisasi MSC

Penelitian menunjukkan bahwa *Mesenchymal Stem Cells* (MSC), saat ditransplantasikan secara sistemik, dapat bermigrasi ke area kerusakan jaringan pada hewan percobaan, menunjukkan kemampuan migrasi MSC. Mekanisme di balik migrasi MSC masih belum jelas sepenuhnya. Reseptor kemokin dan ligannya, bersama dengan molekul adhesi, berperan penting dalam homing ke jaringan spesifik melalui leukosit.[40]

Penelitian telah melaporkan ekspresi fungsional dari berbagai reseptor kemokin dan molekul adhesi pada MSC manusia. Mengoptimalkan potensi migrasi MSC melalui modulasi interaksi reseptor kemokin dapat meningkatkan kemampuan MSC untuk

memperbaiki kelainan bawaan pada jaringan mesenchymal atau memperbaiki jaringan secara in vivo.[41] Jaringan yang rusak melepaskan mediator sinyal untuk memobilisasi MSC menuju lokasi kerusakan tersebut.[41] Beberapa mediator sinyal yang dikenal termasuk VEGF, *granulocyte colony stimulating factor* (GCSF), *chemokines, erythropoietin* (EPO), *stromal-derived factor-1* (SDF-1), *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), *fibroblast growth factor, angiopoietin-2, platelet-derived growth factor-CC, stem cell factor* (SCF), *placental growth factor* (PlGF), serta beberapa *interleukin* (IL-8, IL-6, IL-3, IL-2, IL-1β).[41]

2.4.3. Konsep Small Molecule Growth Factor MSC

Terminologi fungsional MSC didasarkan pada kemampuannya untuk melepaskan berbagai molekul larut melalui mekanisme parakrin. Konsep parakrin berarti MSC berkomunikasi dengan sel dan matriks di sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepaskan.[6] Konsep faktor pertumbuhan molekul kecil MSC melibatkan beberapa aspek:

1. Kompleksitas teknik isolasi MSC: Teknik dan metode untuk mengisolasi MSC memerlukan prosedur yang kompleks, termasuk kerja aseptis dan waktu kultur selama beberapa minggu untuk menghasilkan MSC yang homogen dengan potensi stemness tinggi, terutama kemampuan multi-diferensiasi menjadi berbagai jenis sel jaringan spesifik. Banyak faktor yang harus

dikendalikan untuk mencapai hasil optimal karena banyak hal yang mempengaruhi hasil akhir isolasi.

2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat: Penelitian menunjukkan bahwa waktu paruh kehidupan MSC setelah integrasi dalam jaringan cedera pasca transplantasi adalah singkat, sehingga fungsi regeneratif MSC mungkin tidak optimal. Faktor-faktor internal dalam jaringan cedera juga mempengaruhi waktu paruh kehidupan MSC.[42]
3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi: Penelitian terkini menunjukkan bahwa sebagian besar MSC yang diberikan secara intravena terjebak di paru sebagai emboli kecil (tanpa menyebabkan oklusi vaskuler). Namun, MSC yang terjebak ini tetap melepaskan berbagai molekul antiinflamasi dan pro-regenerasi. Ini menunjukkan bahwa molekul kecil dan eksosom yang dilepaskan oleh MSC secara parakrin adalah faktor utama dalam regenerasi jaringan.[41,43]

2.4.4. Induksi Small Molecule dan Exosome MSC

Peran penting molekul kecil dan eksosom MSC telah mendorong berbagai upaya untuk memproduksi molekul kecil dan eksosom ini secara in vitro. Induksi molekul kecil faktor pertumbuhan MSC dibagi menjadi dua metode:

1. Induksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi: MSC yang diaktifkan oleh TNF-α secara teoritis dapat melepaskan berbagai molekul anti-inflamasi.[43]
2. Induksi MSC dengan teknik hipoksia: MSC yang diinkubasi dalam kondisi hipoksia akan melepaskan berbagai molekul pro-regenerasi. Teori ini disebut hypoxic preactivated MSC-induced soluble molecule, yaitu molekul-molekul terlarut yang dilepaskan MSC dalam kondisi hipoksia. Kondisi hipoksia pada MSC diketahui dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 sebagai molekul kecil dan ekspresi berbagai antioksidan seperti GPX, *superoksida dismutase* (SOD)1, SOD2, *Catalase* (CAT), dan *sirtuin* (SIRT)1 dan 3 yang terakumulasi dalam eksosom. Produksi IL-10 oleh MSC dapat menghambat faktor transkripsi *nuclear factor kappa B* yang memicu overekspresi ROS. Selain itu, antioksidan yang diekspresikan langsung oleh MSC melalui eksosom, seperti GPX, dapat mengaktivasi faktor transkripsi NRF2 yang meningkatkan ekspresi antioksidan. Selain itu, berbagai miRNA dalam eksosom MSC hipoksia, seperti miR-21, miR-22-3p, dan miR-215-5p, juga berperan dalam menghambat stres oksidatif.[43]

2.4.5 *Exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC)

Eksosom adalah vesikel nanoskala yang berasal dari sel dengan diameter 40–160 nm, struktur membran dwi lapis, dan membawa informasi

gen penting, seperti protein, karbohidrat, lipid, dan asam nukleat. Protein yang diperkaya dalam eksosom meliputi protein transpor membran (GTPase dan aneksin), tetraspanin (CD63, CD81, CD82, dan CD9), protein terkait biogenesis (kompleks ESCRT, ALIX, dan TSG101), dan protein syok panas (HSP60, 70, dan 90), yang secara umum dikenal sebagai biomarker karakteristik eksosom. Eksosom memiliki kapasitas untuk berfungsi sebagai pemancar antarsel untuk memengaruhi sel-sel tetangga, sambil mempertahankan beberapa sifat biologis sel induknya.

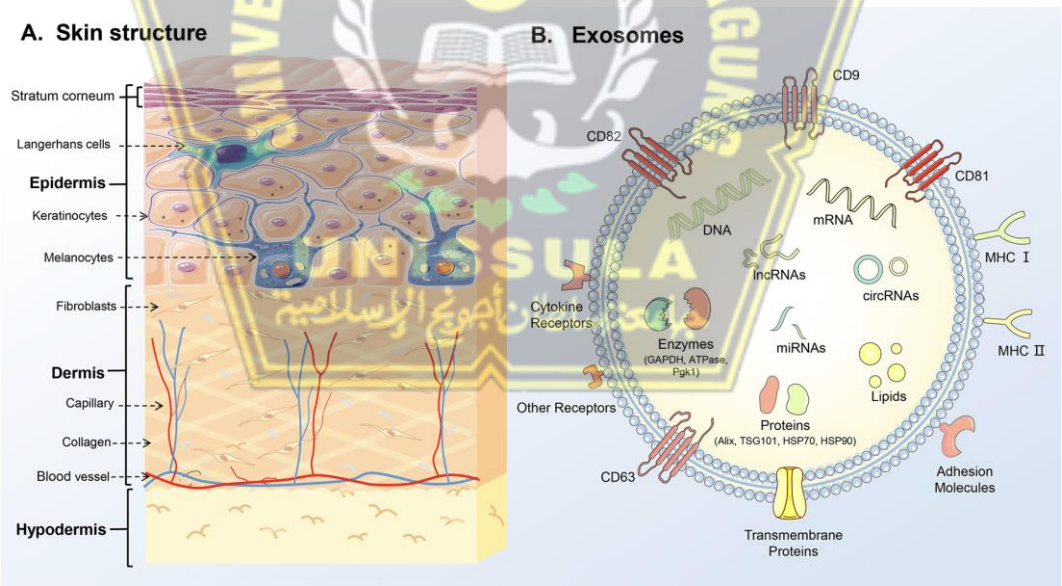
Eksosom dapat memodulasi proses seluler penting, seperti proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan kematian sel, yang bervariasi tergantung pada asal eksosom, keadaan fisiologis dan patologis, dan bahkan tempat pelepasan seluler yang tepat. Bukti yang muncul telah mengonfirmasi bahwa eksosom terlibat dalam berbagai perkembangan penyakit, yang menunjukkan potensi eksosom dan muatan eksosom sebagai biomarker diagnostik dan terapeutik. Di kulit, transfer informasi yang dimediasi eksosom dan komunikasi antar sel diperlukan untuk mempertahankan fungsi seluler dan homeostasis jaringan. Penelitian telah menunjukkan bahwa eksosom endogen yang berpindah-pindah dalam berbagai jenis sel kulit, berpartisipasi dalam mekanisme molekuler kompleks penyakit kulit inflamasi kronis. Oleh karena itu, isi eksosom dapat menjadi biomarker potensial untuk mendiagnosis dan mengobati disfungsi dan penyakit kulit. Yang lebih penting, eksosom dari sel punca dan jenis sel lainnya, dapat menjadi pilihan terapi dalam pengobatan regeneratif dan estetika, terutama dalam pencegahan dan pengurangan bekas

luka, pengaturan pigmentasi, dan pertumbuhan rambut. Misalnya, eksosom yang disekresikan oleh melanosit dapat mengatur pigmentasi kulit, dan eksosom yang berasal dari jenis sel lain yang berada di kulit juga dapat memengaruhi produksi melanin dalam melanosit.

Eksosom yang berasal dari MSC juga diklasifikasikan sebagai non-sensitizer potensial dalam uji sensitisasi kulit, dan aman untuk digunakan sebagai pengobatan topikal tanpa efek samping. Potensi eksosom sebagai agen terapeutik, bahan kosmetik, atau untuk diferensiasi lainnya. Selain keratinosit, melanosit, sel Langerhans, dan beberapa jenis sel lainnya juga ditemukan di epidermis. Lapisan ketiga adalah dermis yang kaya akan protein *Extracellular Matrix* (ECM) dan faktor pertumbuhan, yang dikaitkan dengan keberadaan berbagai garis keturunan fibroblas dermal. Hipodermis atau lapisan subkutan terakhir dikelilingi oleh adiposit, *Mesenchymal Stem Cells (*MSC), dan jaringan ikat. Jenis sel penting dalam lapisan kulit, termasuk keratinosit, fibroblas, makrofag, adiposit, memiliki kapasitas untuk berkomunikasi secara timbal balik di lingkungan kulit, dan dapat memicu respons kompleks setelah rangsangan internal dan eksternal.

Penyakit kulit dianggap sebagai masalah medis yang mengancam dengan prevalensi yang meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Susunan genetik, gaya hidup, nutrisi, radiasi matahari dan sensitivitas matahari, paparan logam berat dan partikel atmosfer, dan pengaruh lingkungan lainnya dapat menyebabkan sitotoksisitas dermal, gangguan penghalang kulit, protein matriks, dan aktivasi reaksi peradangan. Hilangnya konstituen kulit, fungsi

fisiologis, dan kerusakan struktur normal, dapat menyebabkan kelainan kulit, termasuk penuaan kulit, dermatosis berpigmen, beberapa dermatosis yang dimediasi imun, penyakit jaringan ikat, dan penyembuhan kulit yang buruk setelah cedera. Untuk memperbaiki kondisi kulit dan mengobati penyakit kulit, ada banyak metode seperti perawatan kulit, laser, obat-obatan, pembedahan, dan terapi sel. Meskipun demikian, metode-metode ini belum mencapai efek ideal untuk perbaikan dan regenerasi kulit dengan kerugian masing-masing. Oleh karena itu, mengidentifikasi patogenesis dan menetapkan pendekatan yang efektif sangat penting untuk mempercepat regenerasi kulit dan memulihkan fungsi kulit yang rusak.[44]

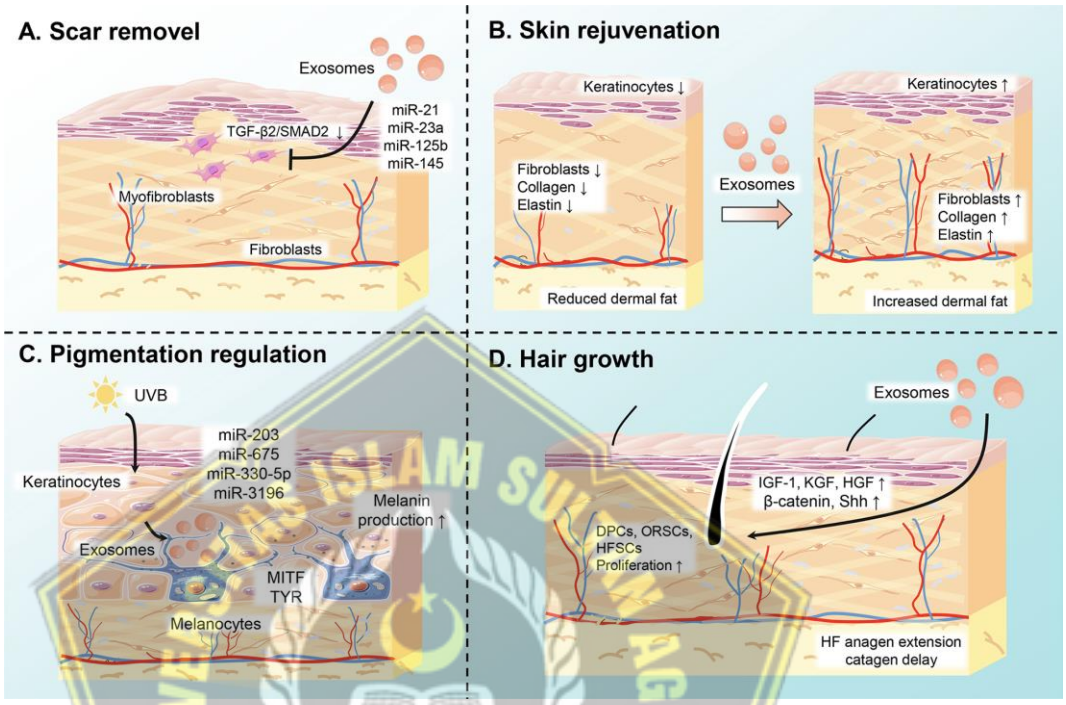


Gambar 2.2 EH-MSC pada konteks hiperpigmentasi.[44]

Eksosom dalam regulasi pigmentasi Keratinosit, yang menempati posisi penting pada unit melanin epidermis, telah dilaporkan mengeluarkan eksosom yang mengandung faktor terlarut dan miRNA, untuk berpartisipasi

dalam modulasi pigmentasi dan homeostasis kulit. Takano dkk. menemukan bahwa fraksi eksosom yang diisolasi dari keratinosit yang diradiasi UVB secara signifikan mengaktifkan melanosit, yang menunjukkan validitas perubahan kuantitatif dalam eksosom yang disekresikan oleh keratinosit pada regulasi substansial perkembangan warna kulit manusia. Liu dkk. menyarankan bahwa keratinosit berinteraksi dengan melanosit dalam unit melanin epidermis melalui miRNA eksosomal. Mereka menemukan bahwa eksosom keratinosit mengekspresikan miR-330–5p secara berlebihan dan menyebabkan penurunan signifikan dalam produksi melanin dan ekspresi *Tyrosinase* (TYR) dalam melanosit. Cicero dkk. melaporkan bahwa profil miRNA dari eksosom keratinosit dimodifikasi dengan stimulasi UVB. Mereka menemukan bahwa eksosom dari keratinosit yang mengandung miR-3196 meningkatkan kandungan melanin intraseluler melanosit manusia melalui jalur pensinyalan yang bergantung pada *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF). Selain itu, eksosom yang berasal dari keratinosit mengekspresikan miR-203 secara tinggi untuk mengatur melanogenesis pada sel melanoma, meningkatkan pigmentasi dan kadar protein TYR. Kim et al. menunjukkan bahwa miR-675 yang dilepaskan dari eksosom keratinosit terlibat dalam melanogenesis yang distimulasi penurunan regulasi lncRNA H19, dengan menghambat ekspresi MITF melalui penargetan wilayah 3'-untranslated-nya. Eksosom, sebagai komunikasi untuk transfer pigmen dari melanosit ke keratinosit, terus dieksplorasi untuk mencegah pigmentasi yang tidak biasa. Studi pada

eksosom antara keratinosit dan melanosit akan membuka jalan bagi strategi baru untuk memanipulasi pigmentasi dalam keadaan sehat dan sakit.



Gambar 2.3 Mekanisme eksosom dalam estetika medis kulit.[44]

Mekanisme eksosom dalam estetika medis kulit. (A) Eksosom dari MSC yang berasal dari tali pusat, diperkaya dengan miR-21, miR-23a, miR-125b, dan miR-145, menargetkan jalur TGF-β2/SMAD2 untuk menghambat diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas, sehingga mengurangi fibrosis berlebihan dan pembentukan jaringan parut. (B) Eksosom dapat meningkatkan fungsi keratinosit dan fibroblas, meningkatkan sintesis kolagen dan elastin, dan meningkatkan lemak kulit, sehingga meningkatkan kapasitas regeneratif dan restoratif untuk anti-penuaan kulit. (C) Setelah terpapar UVB, eksosom yang berasal dari keratinosit memodulasi kandungan miRNA mereka untuk meningkatkan pigmentasi melanosit melalui jalur pensinyalan yang bergantung pada miR-3196 dan MITF atau jalur

pensinyalan yang tidak bergantung pada miR-203 dan MITF. Bahasa Indonesia: Ekspresi berlebihan miR-330–5p dalam eksosom yang berasal dari keratinosit menurunkan produksi melanin dan ekspresi TYR dalam melanosit. Dan miR-675 dari eksosom keratinosit terlibat dalam melanogenesis yang distimulasi oleh penurunan regulasi lncRNA H19, dengan menghambat ekspresi MITF. (D) Eksosom yang berasal dari sel papila dermal meningkatkan viabilitas DPC, ORSC, dan HFSC, meningkatkan ekspresi IGF-1, KGF, HGF, *β-catenin*, dan Shh, dan juga mempercepat timbulnya anagen HF, katagen yang tertunda, batang rambut yang lebih panjang di kulit tikus. *Hair Follicle Stem Cells*, HFSC; *Dermal Papilla Cells*, DPC; *Hair Follicle*, HF; *Olfactory Receptor Stem Cells*, ORSC; *Transforming Growth Factor Beta*, TGF-β; *Keratinocyte Growth Factor*, KGF; *Insulin-like Growth Factor*, IGF; *Hepatocyte Growth Factor*, HGF; *Sonic Hedgehog*, Shh; *Ultraviolet B*, UVB; *Microphthalmia-associated Transcription Factor*, MITF; *Tyrosinase*, TYR.[44]

2.5. Injeksi Glutahione dan Vitamin C

Kombinasi injeksi Glutathione dengan Vitamin C dalam pengobatan hiperpigmentasi menunjukkan potensi yang signifikan melalui mekanisme yang sinergis.[45] Glutathione, sebagai antioksidan kuat, memainkan peran penting dalam menetralkan radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif dalam sel kulit.[37] Hal ini dicapai melalui jalur glutation-*S*-*transferase* (GST), yang mengurangi produksi melanin dengan mengubah *eumelanin* (pigmen gelap) menjadi *pheomelanin* (pigmen terang).[46] Selain itu, Glutathione dapat

menghambat enzim tirosinase, yang merupakan kunci dalam proses melanogenesis, sehingga mengurangi produksi melanin yang berlebihan dan membantu mencerahkan kulit yang hiperpigmentasi.[47]

Vitamin C, atau asam askorbat, bekerja sinergis dengan Glutathione melalui beberapa mekanisme.[46,47] Sebagai antioksidan, Vitamin C meningkatkan kadar Glutathione dalam tubuh dan menetralkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada kulit.[47] Selain itu, Vitamin C juga menghambat aktivitas enzim tirosinase, yang secara langsung mengurangi produksi melanin.[47] Lebih lanjut, Vitamin C berperan dalam regenerasi dan perbaikan kulit dengan merangsang sintesis kolagen, yang membantu memperbaiki tekstur kulit dan mencerahkan noda hitam.[47]

Kombinasi injeksi kedua zat ini dapat meningkatkan efektivitas terapi hiperpigmentasi.[38] Glutathione dan Vitamin C bekerja melalui jalur redoks dan sinyal antioksidan untuk menekan respon inflamasi yang diinduksi oleh paparan UV, yang sering kali menjadi penyebab utama hiperpigmentasi.[38] Mereka juga mengurangi ekspresi gen pro-inflamasi seperti IFN-γ dan CD68, yang berperan dalam respon imun dan inflamasi.[38,47] Dengan mengurangi stres oksidatif dan inflamasi serta menghambat produksi melanin, kombinasi Glutathione dan Vitamin C secara efektif dapat mengatasi hiperpigmentasi dan memberikan hasil yang lebih cerah dan merata pada kulit.[48]

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengevaluasi dosis optimal, frekuensi, dan metode aplikasi yang paling efektif dalam kombinasi ini. Namun, bukti klinis yang ada menunjukkan bahwa terapi kombinasi ini dapat

menjadi pendekatan yang efektif dan aman untuk mengatasi berbagai jenis hiperpigmentasi, termasuk melasma dan hiperpigmentasi pasca-inflamasi.[49]

2.5.1 Mekanisme kerja Glutatione mereduksi ROS

ROS bertindak sebagai molekul pemberi sinyal yang penting untuk pertumbuhan dan proliferasi sel, peningkatan produksi ROS dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel, karena mitokondria adalah salah satu organel intraseluler utama produksi ROS dan merupakan target ROS yang paling rentan, akumulasi ROS yang tidak memadai akibat stres oksidatif telah dikenal sebagai salah satu mekanisme yang menyebabkan apoptosis setelah kerusakan DNA yang terkait dengan disfungsi mitokondria.[50] Peningkatan kadar ROS disebabkan oleh perubahan keseimbangan redoks intraseluler sel, dan kegagalan mekanisme antioksidan untuk menghilangkan produksi ROS dapat meningkatkan hal ini. Selain itu, akumulasi ROS di luar fungsi antioksidan sel dapat mengurangi *Matrix Metalloproteinase* (MMP), indeks kinerja rantai transpor elektron, yang mengakibatkan produksi *Adenosine Triphosphate* (ATP) yang terganggu. Selanjutnya, faktor apoptogenik seperti sitokrom c dilepaskan ke dalam sitoplasma dari ruang antarmembran mitokondria akibat hilangnya MMP, dan kaskade kaspase diaktifkan, yang pada akhirnya dapat memicu apoptosis. Pada akhirnya, kadar ATP intraseluler juga dapat digunakan sebagai indeks penting untuk menilai homeostasis metabolisme energi mitokondria yang terkait dengan stres oksidatif. Meskipun sel memiliki berbagai sistem perlindungan antioksidan endogen untuk melindungi terhadap efek berbahaya dari ROS, enzim ini tidak

dapat secara efektif menghilangkan pembentukan ROS yang berlebihan. Oleh karena itu, suplementasi antioksidan telah diusulkan sebagai strategi untuk mencegah akumulasi radikal bebas melalui aktivitas jalur sinyal yang sesuai dengan produksi ROS.[51]

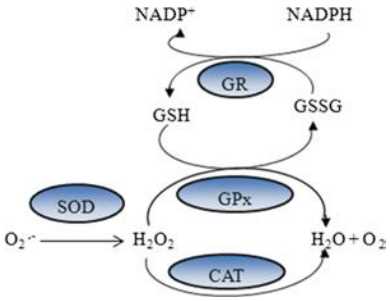
Glutathione (GSH) adalah tripeptida yang mengandung tiol yang terdapat di mana-mana yang terdiri dari L-sistein, asam L-glutamat, dan glisin, dan merupakan salah satu antioksidan sel yang paling banyak dipelajari yang saat ini sedang diteliti. Banyak antioksidan yang digunakan untuk memblokir stres oksidatif diubah secara kimiawi menjadi produk oksidasi yang bereaksi dengan glutation untuk membentuk adduct glutation selama perlindungan terhadap radikal bebas. Efek pertahanan antioksidan glutation berperan penting dalam mengatur proliferasi sel dan kematian sel melalui mediasi jalur pensinyalan regulasi redoks utama dalam sel.[51]

Paparan sinar UV kronis menyebabkan gangguan pigmentasi kulit dan berbagai tanda *photoaging*, seperti eritema, hiperkeratosis, solar lentigo, melasma, kerutan, dan kulit kendur. Mempertahankan homeostasis redoks seluler yang stabil sangat penting untuk mengurangi kerusakan akibat sinar UV pada tahap awal. Hal ini dicapai melalui jaringan antioksidan seluler, yang mencakup antioksidan enzimatik seperti *Catalase* (CAT), *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathione Peroxidase* (GPX) dan *Thioredoxin* (TRX), serta antioksidan nonenzimatik seperti *Glutathione* (GSH), vitamin C, dan vitamin E. Tripeptida GSH memainkan peran utama dalam membersihkan

ROS, meregenerasi antioksidan lain, dan bertindak sebagai kofaktor dalam sistem GSH dan tioredoksin.[52]

Rasio GSH terhadap GSSG berfungsi sebagai indikator utama keadaan redoks seluler dan umumnya digunakan sebagai biomarker awal dan sensitif. Salah satu mekanisme pertahanan paling luar biasa terhadap kerusakan akibat sinar UV melibatkan peralihan metabolisme dari katabolisme glukosa ke jalur pentosa fosfat oksidatif, yang menghasilkan regenerasi GSH yang cepat dalam hitungan detik setelah paparan sinar UV. Meskipun mekanisme regenerasi ini cepat, kulit yang terpapar sinar matahari menunjukkan penurunan rasio GSH/GSSG, yang menunjukkan bahwa regenerasi akut GSH tidak memadai untuk mengkompensasi hilangnya GSH selama paparan sinar UV yang berkepanjangan. Pengisian kembali kadar GSH dari prekursor asam amino dapat menangkal peningkatan kadar ROS yang disebabkan oleh paparan sinar UV berulang.[52]

Glutathione Peroxidase (GPx) adalah sekelompok enzim yang bergantung pada selenium, dan terdiri dari sitosol, plasma, hidroperoksida fosfolipid, dan glutathione peroksidase gastrointestinal.[53]



Antioksidan sekunder meliputi *Glutathione Reductase* (GR) dan *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* (G6PDH). G6PDH menghasilkan NADPH. GR diperlukan untuk mendaur ulang *Glutathione* tereduksi (GSH) menggunakan enzim sekunder GR dan NADPH.[54]

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + NADPH \xrightarrow{GR} NADP + 2GSH$$

Glutation adalah antioksidan jenis peptida yang mengandung sistein dan disintesis di dalam sel-sel tubuh. Kelompok tiol dalam bagian sisteinnya adalah agen pereduksi dan dapat dioksidasi dan direduksi secara reversibel. Glutation dalam kadar tinggi ditemukan di dalam sel (~3.100 µg/g jaringan), dipertahankan dalam bentuk tereduksi (GSH) oleh enzim GR, dan pada gilirannya mereduksi metabolit dan sistem enzim lainnya, seperti askorbat. Karena konsentrasinya yang tinggi dan perannya dalam mempertahankan keadaan redoks di dalam sel, glutation dianggap sebagai salah satu antioksidan seluler yang paling penting.[55]

2.5.2 Mekanisme kerja Vitamin C menurunkan ROS

Vitamin C merupakan faktor koenzimatik penting untuk fungsi dan kelangsungan hidup sel. In vivo atau in vitro, vitamin C mengalami oksidasi menjadi *Docosahexaenoic Acid* (DHA), yang didorong oleh oksidan seperti *Hydrogen Peroxide* (H2O2) atau dikatalisis oleh enzim vitamin C oksidase. In vivo, DHA memiliki waktu paruh hanya beberapa menit, dan biasanya akan direduksi kembali menjadi vitamin C oleh tioredoksin reduktase,

dehidroaskorbat oksoreduktase, dan 3-α-hidroksisteroid dehidrogenase. Vitamin C mudah mengalami autooksidasi menjadi anion superoksida dan anion askorbil. Degradasi vitamin C dapat dicegah oleh gugus fosfat dalam media kultur sel.[56]

Vitamin C merupakan antioksidan paling dikenal yang dapat membersihkan berbagai jenis radikal, misalnya, OH^-, H2O2, dan $O2^-$. Vitamin C menyumbangkan satu elektron ke $O2^-$ untuk menghasilkan ASC^- atau kehilangan elektron kedua untuk membentuk bentuk teroksidasinya, DHA. Studi observasional menunjukkan kapasitas antioksidan vitamin C bahkan ketika enzim antioksidan, seperti SOD dan CAT menurun. Vitamin C dapat secara langsung menurunkan kadar dengan meningkatkan fungsi mitokondria rantai transpor elektron. Vitamin C juga mempertahankan kadar antioksidan intraseluler, termasuk Mn-SOD, GPx, CAT, Cu/Zn-SOD, dan glutathione. Meskipun vitamin C dapat dianggap sebagai efektor potensial dalam strategi manajemen penyakit, kehati-hatian harus dilakukan terkait dosis dan pemberiannya yang bergantung pada waktu, terutama pada dosis yang melebihi.[56]

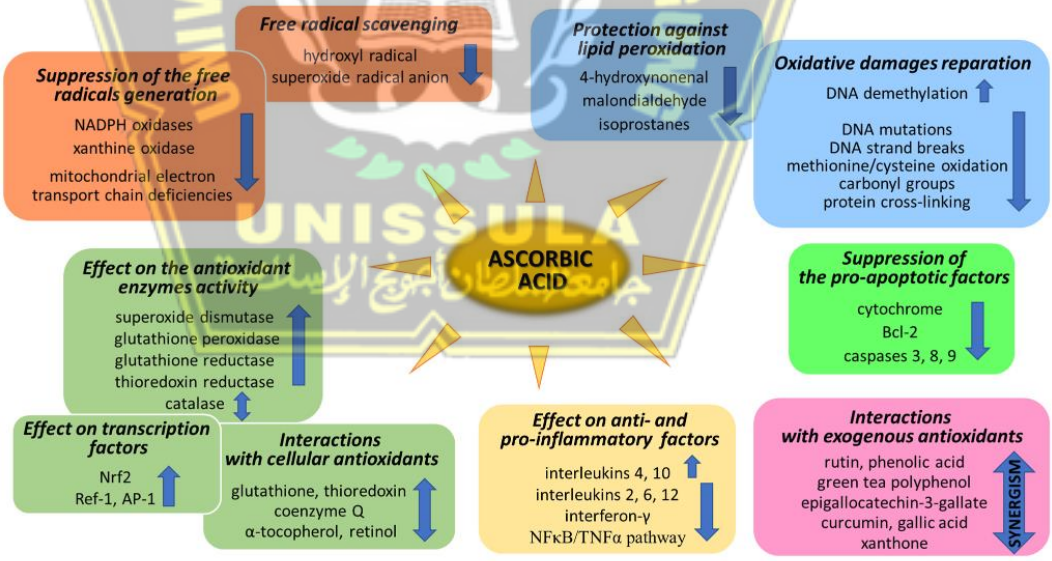
Penelitian melaporkan efek vitamin C (asam L-askorbat, AA) pada kerusakan sel yang disebabkan oleh sinar UVB. Perlakuan pra-dan pasca-AA pada permukaan epidermis menekan kematian sel yang disebabkan oleh sinar UVB, apoptosis, kerusakan DNA, dan respons inflamasi dengan menurunkan ekspresi dan pelepasan *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF-α). Selain itu, perawatan pra-AA lebih efektif dalam mencegah kerusakan kulit akibat sinar

UVB daripada perawatan pasca-AA. Perawatan epidermis sebelum dan sesudah AA mencegah kerusakan akibat sinar UVB. Vitamin C secara jelas menghambat kerusakan kulit, seperti kematian sel, apoptosis, dan putusnya untai ganda DNA, yang disebabkan oleh penyinaran UVB pada epidermis.[57]

Asam askorbat merupakan salah satu antioksidan molekul rendah yang berfungsi dalam tubuh manusia. Berperan dalam pengaturan ROS dan efektivitas antioksidan lainnya. Asam askorbat mengatur kadar ROS sejak tahap pembentukannya. Sumber utama ROS adalah rantai pernapasan mitokondria dan enzim tertentu, seperti *NADPH oksidase* (NOX) atau *Xanthine Oxidase* (XO). XO merupakan enzim yang menghasilkan ROS melalui oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan kemudian menjadi asam urat. Kedua reaksi ini diperlukan untuk berfungsinya organisme, tetapi akibat dari kemunculannya adalah hidrogen peroksida dan pembentukan anion radikal superoksida. Diketahui bahwa XO juga dapat mengoksidasi askorbat secara langsung, suplementasi askorbat secara signifikan melindungi organisme terhadap hiperaktivitas XO. Askorbat tidak memiliki efek pada aktivitas XO dalam kondisi fisiologis, seperti yang ditemukan pada sel kulit (fibroblas dan keratinosit). Namun, pada sel yang mengalami stres yang disebabkan oleh, misalnya, radiasi UV atau hidrogen peroksida, pengobatan dengan askorbat (100 μM) menghambat hiperaktivasi XO.[58]

NOX adalah sekelompok enzim yang tersebar luas di sel transmembran yang, mirip dengan XO, menghasilkan anion radikal superoksida atau hidrogen peroksida sebagai molekul pemberi sinyal, yang kadarnya yang

terkendali memungkinkan sel berfungsi dengan baik. Namun, hiperaktivitas NOX pasti menyebabkan stres oksidatif, yang dapat dicegah dengan askorbat. Seperti yang dijelaskan dalam kasus XO pada sel kulit, aktivitas NOX juga tidak terpengaruh oleh askorbat (100 μM) pada sel sehat. Hanya pemicu stres yang kuat, seperti hidrogen peroksida atau radiasi UVB, yang mengaktifkan NOX dengan cukup kuat agar askorbat mulai menghambat enzim. Data lain menunjukkan bahwa, karena asam askorbat dapat menghambat NOX pada sel endotel mikrovaskular, vitamin tersebut dapat mengurangi perkembangan sepsis. Namun, askorbat (100 μM) juga menunjukkan sifat pengaktifan NOX pada sel induk embrionik, di mana kardiomiogenesis meningkat sebagai akibat dari peningkatan kadar ROS yang diinduksi NOX.



Gambar 2.4 Mekanisme kerja antioksidan asam askorbat. [58]

Mitokondria juga memainkan fungsi penting dalam aksi antioksidan askorbat. Di satu sisi, karena aktivitas Kompleks II dan III, mitokondria

meregenerasi askorbat dari bentuk teroksidasinya, sehingga mempertahankan status redoks baik dalam matriks mitokondria maupun dalam sitoplasma. Di sisi lain, askorbat (5 mM) mendukung penyegelan rantai transpor elektron mitokondria dan mengurangi pembentukan anion radikal superoksida, terutama pada sel dengan defisiensi rantai transpor elektron. Namun, efek yang dijelaskan menimbulkan kekhawatiran apakah pengaruh askorbat pada proses mitokondria tidak mengurangi eliminasi sel yang rusak melalui apoptosis, sehingga mendorong karsinogenesis.[58]

Aspek lain dari aksi asam askorbat sebagai antioksidan adalah efeknya pada ekspresi gen, yang menghasilkan biosintesis protein antioksidan. Di antara faktor transkripsi terpenting yang terlibat dalam respons antioksidan seluler adalah Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-like 2*), Ref-1 (*redox effector factor 1*), dan AP-1 (*activator protein 1*). Nrf2 adalah protein yang umum di sitoplasma terlepas dari kondisi oksidasi-reduksi. Dalam kondisi fisiologis, protein ini terikat pada inhibitornya, yaitu Keap1, yang dalam kondisi oksidatif mengubah konformasi dan terdisosiasi dari Nrf2. Bentuk bebas Nrf2 ditransfer ke nukleus, mengalami heterodimerisasi dengan protein sMaf. Kompleks yang terbentuk mampu mengikat DNA dengan cara yang spesifik terhadap urutan, yaitu, *Antioxidant Response Element* (ARE), dan memulai biosintesis protein antioksidan. Askorbat (2,9–224,5 mg/kg/hari) dikenal sebagai aktivator faktor Nrf2, serta seluruh jalur Keap1/Nrf2/ARE, dan defisiensinya menyebabkan gangguan aksi Nrf2 yang mengakibatkan peradangan dan apoptosis, terlihat pada sel-sel yang mengalami stres

oksidatif yang diinduksi secara kimia atau fisik. Hal tersebut merupakan hal yang paling penting dalam kasus sel-sel yang terus-menerus terpapar stresor berbahaya, seperti hepatosit dan keratinosit. Di satu sisi, pada keratinosit, askorbat (100 μM) mengurangi tingkat penghambat Nrf2, yaitu protein Keap1, dan meningkatkan ekspresi Nrf2 bebas, serta aktivatornya, termasuk p62 dan KAP1, di sisi lain. Pada saat yang sama, askorbat (1 mM) mendukung perubahan konformasi Keap1 yang diinduksi oleh antioksidan lain, seperti polifenol, yang juga merangsang disosiasi Nrf2.

Pada hepatosit, aktivasi Nrf2 oleh asam askorbat (1–10 μM) menghasilkan ekspresi enzim antioksidan yang diamati sebagai penurunan kadar lipid hidroperoksida. Di sisi lain, beberapa data menunjukkan bahwa konsentrasi asam askorbat yang tinggi (1 mM) dapat menyebabkan gangguan aktivasi jalur Keap1/Nrf2/ARE. Namun, sesuai dengan peran ganda Nrf2 dalam kanker, aktivasinya oleh askorbat menjadi hasil yang ambigu dan mungkin berbahaya.

Aktivitas faktor Ref-1 dan AP-1 saling terkait erat. Ref-1 adalah endonuklease yang bergantung pada Trx yang memfasilitasi aktivitas pengikatan DNA AP-1, sementara AP-1 adalah heterodimer yang terdiri dari protein yang termasuk dalam keluarga c-Fos, c-Jun, ATF, dan Maf dan menunjukkan aktivitas transkripsi melalui regulasi ekspresi gen sebagai respons terhadap berbagai rangsangan, termasuk sitokin, faktor pertumbuhan, dan stres oksidatif. Hanya askorbat teroksidasi (1 μM) yang secara tidak langsung memengaruhi aktivitas Ref-1, sesuai dengan penurunan kadar Trx.

Dalam kasus asam askorbat AP-1, telah dikenali sebagai molekul yang meredam aksi askorbat dalam keratinosit epidermis, sehingga mencegah sel-sel ini tetap hidup ketika DNA mereka dimodifikasi secara oksidatif, yang akan menimbulkan ancaman berupa pembentukan kanker. Selain itu, pada keratinosit yang terpapar radiasi UV, tempat AP-1 seharusnya diaktifkan, suplementasi dengan asam askorbat menyebabkan penurunan kadar komponen positif aktif, yaitu c-Jun, dan meningkatkan kadar pembawa pesan fra-1, yang merupakan penghambat AP-1. Di sisi lain, pembungkaman aktivitas AP-1 yang serupa oleh askorbat (200 μM) diamati pada sel epitel pernapasan, yang mengakibatkan penurunan kadar molekul pemberi sinyal, seperti kemokin pro-inflamasi.[58]

2.6. Pengaruh kombinasi exosome, glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen Interferon Gama dan CD68

Pengaruh Exosome dan Glutation dengan Vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada hiperpigmentasi dapat dijelaskan melalui beberapa mekanisme yang saling terkait.[59] Exosome adalah vesikel kecil yang dikeluarkan oleh sel dan mengandung berbagai molekul bioaktif seperti protein, lipid, dan RNA. Dalam dermatologi, exosome memiliki potensi besar dalam mempengaruhi proses seluler termasuk regenerasi sel, penyembuhan luka, dan modulasi sistem imun. Exosome dapat mengubah ekspresi gen dengan mengirimkan miRNA atau molekul sinyal lainnya yang mempengaruhi aktivitas sel, termasuk sel imun dan melanosit yang berperan dalam hiperpigmentasi.[2,3]

Glutathione, sebagai antioksidan kuat, memainkan peran penting dalam detoksifikasi dan menjaga integritas seluler. Dalam konteks kulit, glutathione dikenal mampu mengurangi melanin dengan mengubah *eumelanin* (pigmen gelap) menjadi *pheomelanin* (pigmen terang).[60] Selain itu, glutathione dapat memodulasi ekspresi gen yang terlibat dalam respon inflamasi dan imun, termasuk gen IFN-γ dan CD68. IFN-γ adalah sitokin yang penting dalam respon imun, sedangkan CD68 adalah marker makrofag, keduanya berperan dalam proses inflamasi yang dapat mempengaruhi kondisi hiperpigmentasi.[61]

Vitamin C (asam askorbat) juga merupakan antioksidan yang berperan dalam sintesis kolagen dan regenerasi kulit. Vitamin C dapat mengurangi produksi melanin dengan menghambat enzim tirosinase. Selain itu, Vitamin C memiliki kemampuan untuk memodulasi sistem imun dan inflamasi, yang dapat mempengaruhi ekspresi gen IFN-γ dan CD68.[62] Vitamin C diketahui mampu mengurangi stres oksidatif dan inflamasi, sehingga secara tidak langsung dapat menurunkan ekspresi gen-gen tersebut dalam kondisi inflamasi kronis atau hiperpigmentasi.[63]

Kombinasi Exosome, Glutathione, dan Vitamin C memberikan efek sinergis pada ekspresi gen IFN-γ dan CD68 melalui berbagai mekanisme seperti pengurangan stres oksidatif, modulasi aktivitas melanosit, dan regulasi respon imun. Penggunaan exosome dapat meningkatkan efektivitas glutation dan Vitamin C dengan meningkatkan penyerapan dan stabilitas mereka dalam kulit. Sementara itu, glutation dan Vitamin C dapat secara langsung mengurangi produksi melanin dan menghambat proses inflamasi.

Secara keseluruhan, kombinasi ini berpotensi mengurangi hiperpigmentasi melalui modulasi ekspresi gen terkait respon imun dan inflamasi, serta melalui pengurangan produksi melanin secara langsung. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami mekanisme spesifik dan efek klinis dari kombinasi ini dalam konteks hiperpigmentasi.[53,55]

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

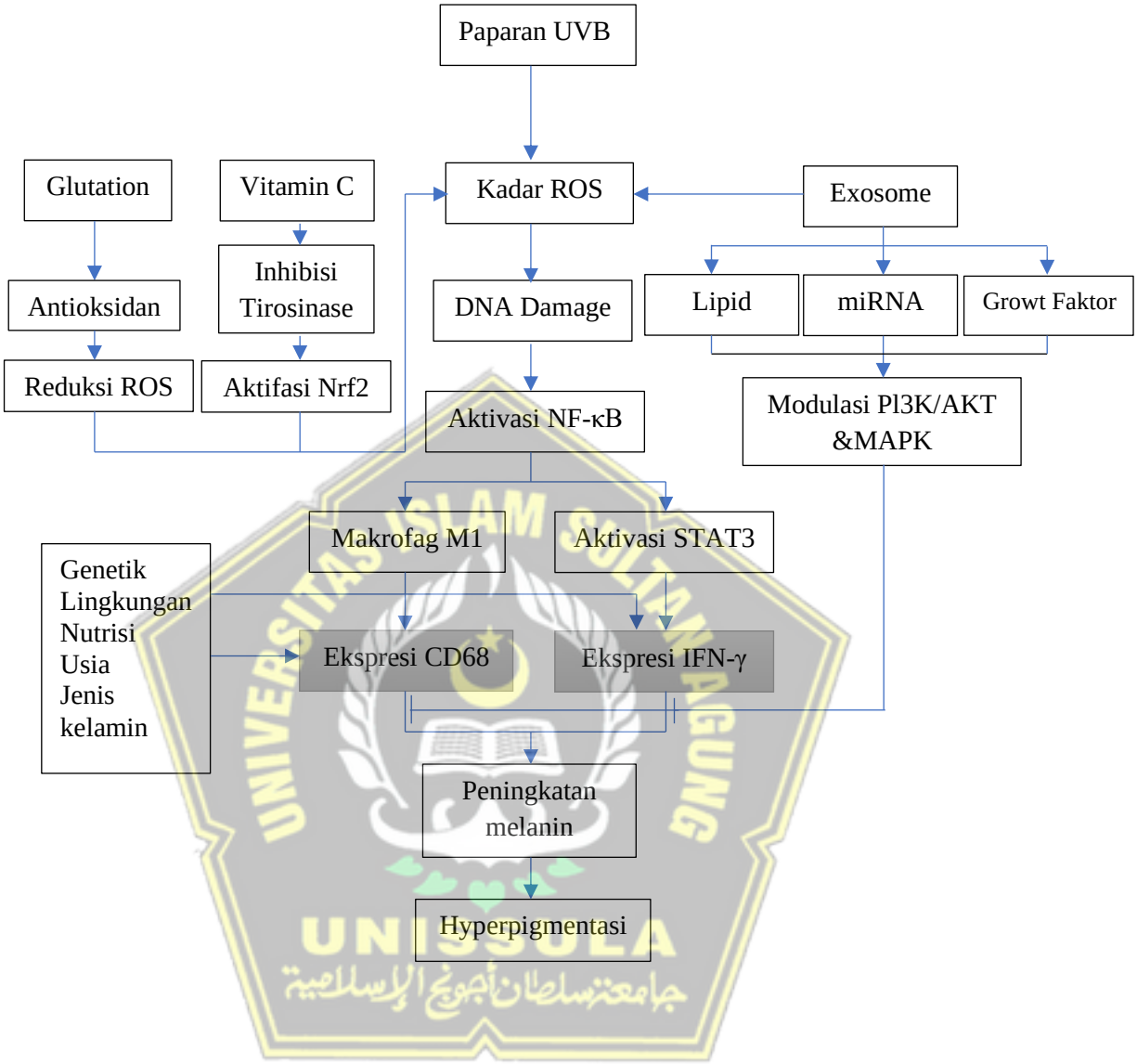
Pengaruh Exosome dan Glutation dengan Vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada hiperpigmentasi dapat dijelaskan lebih mendalam dengan memasukkan jalur (pathway) biologis yang terlibat.[4,20–23] Exosome adalah vesikel kecil yang mengandung berbagai molekul bioaktif seperti protein, lipid, dan RNA.[22–24] Dalam konteks dermatologi, exosome dapat mempengaruhi jalur sinyal seluler, termasuk jalur PI3K/Akt dan MAPK, yang terlibat dalam proliferasi sel, migrasi, dan modulasi sistem imun. Exosome dapat mengirimkan miRNA yang menargetkan gen-gen tertentu, sehingga mempengaruhi aktivitas seluler termasuk melanosit dan sel imun yang berperan dalam hiperpigmentasi.[25–27,64] Melalui jalur ini, exosome dapat memodulasi ekspresi gen IFN-γ dan CD68, yang berperan dalam respon inflamasi dan imun.[65]

Glutation, sebagai antioksidan kuat, berperan penting dalam jalur detoksifikasi dan antioksidasi seluler. Glutation bekerja melalui jalur *Glutathione S-Transferase* (GST) untuk mengurangi stres oksidatif dengan menetralisir radikal bebas. Dalam konteks hiperpigmentasi, glutathione mengurangi produksi melanin dengan mengubah *eumelanin* (pigmen gelap) menjadi *pheomelanin* (pigmen terang) melalui jalur penghambatan tirosinase. Selain itu, glutation dapat mempengaruhi ekspresi gen IFN-γ dan CD68

melalui jalur NF-κB dan Nrf2, yang terlibat dalam respon inflamasi dan antioksidasi.[66,67]

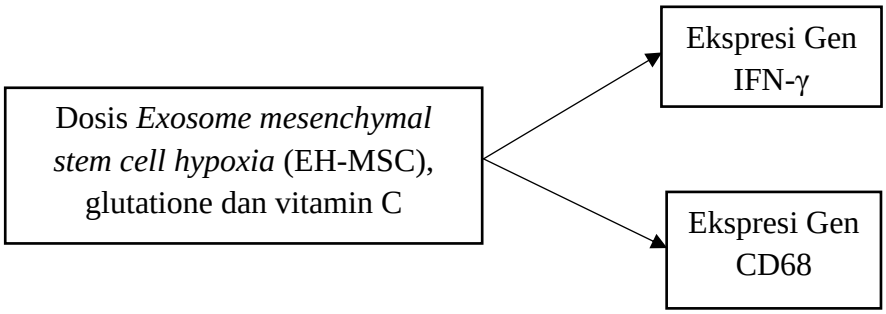
Vitamin C (asam askorbat) adalah antioksidan yang juga berperan dalam sintesis kolagen dan regenerasi kulit. Vitamin C mengurangi produksi melanin dengan menghambat enzim tirosinase melalui jalur redoks, yang berperan dalam regulasi aktivitas tirosinase dan melanosit. Vitamin C juga dapat mempengaruhi sistem imun melalui jalur MAPK dan JAK-STAT, yang mengatur ekspresi gen IFN-γ dan CD68. Vitamin C diketahui dapat mengurangi stres oksidatif dan inflamasi dengan menghambat aktivasi NF-κB, sehingga secara tidak langsung menurunkan ekspresi gen-gen ini dalam kondisi inflamasi kronis atau hiperpigmentasi.[37,38,46,47]

Kombinasi Exosome, Glutathione, dan Vitamin C memberikan efek sinergis pada ekspresi gen IFN-γ dan CD68 melalui berbagai jalur biokimia. Exosome dapat meningkatkan efektivitas Glutathione dan Vitamin C dengan memfasilitasi penyerapan dan stabilitas mereka dalam kulit. Glutathione dan Vitamin C bekerja melalui jalur NF-κB, Nrf2, MAPK, dan JAK-STAT untuk mengurangi stres oksidatif, modulasi aktivitas melanosit, dan regulasi respon imun. Secara keseluruhan, kombinasi ini berpotensi mengurangi hiperpigmentasi melalui modulasi jalur biokimia yang mengatur ekspresi gen terkait respon imun dan inflamasi, serta melalui pengurangan produksi melanin secara langsung. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami mekanisme spesifik dan efek klinis dari kombinasi ini dalam konteks hiperpigmentasi.[48,49]



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh ekspresi gen IFN-γ dengan kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutation dan vitamin C antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.
2. Terdapat pengaruh ekspresi gen CD68 dengan kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutation dan vitamin C antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

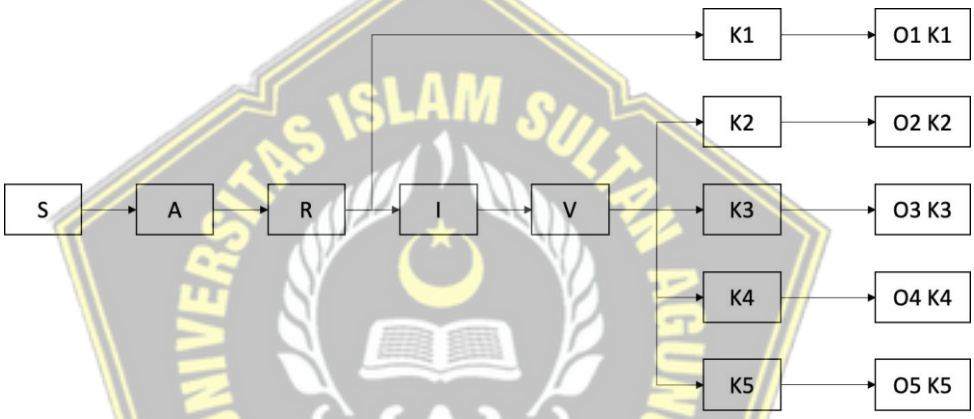
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah mencit jantan galur C57BL/6 dengan bobot badan 20-25 gr.

Perlakuan terdiri dari:



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Sampel

A : Aklimatisasi

R : Randomisasi

I : Induksi UVB

V : Validasi

K1 : Mencit sehat tanpa paparan UVB.

K2 : Kontrol Negatif (Mencit dengan paparan UVB)

K3 : Perlakuan 1 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µL dan vitamin C 1,26µL)

K4 : Perlakuan 2 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi exosome dosis 42µL).

K5 : Perlakuan 3 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µL + vitamin C 1,26µL dan perlakuan injeksi exosome 42µL)

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1 Variabel bebas

Injeksi exosome dan Glutation dengan Vit C

4.2.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen INF-γ dan CD68

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1 Exosome

Exosome adalah vesikel kecil yang mengandung materi genetik dan protein, yang dilepaskan oleh sel dan berfungsi sebagai perantara komunikasi antar sel. Exosome terbagi dalam beberapa kelompok yaitu Perlakuan 2 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan exosome 42µL) dan Perlakuan 3 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µL + vitamin C 1,26µL dan perlakuan exosome 42µL)

Skala: Rasio

4.2.2.2 INF-y

Kadar INF-y adalah konsentrasi INF-y yang diproduksi oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Kadar INF-y dianalisis menggunakan metode *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR).

Unit: %

Skala : rasio

4.2.2.3 CD68

Ekspresi melanin adalah jumlah fraksi area melanin yang diekspresikan oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Ekspresi CD68 dianalisis menggunakan metode qRT-PCR.

Unit: persen fraksi area (%)

Skala: rasio

4.2.2.4 Glutation dan Vit C

Glutation dan Vit C adalah terapi gold standar berupa sediaan injeksi, terbagi dalam beberapa kelompok yaitu perlakuan 1 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µL dan vitamin C 1,26µL) dan perlakuan 3 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µL+ vitamin C 1,26µL dan perlakuan exosome 42µL).

Skala: Rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah mencit jantan galur C57BL/6 berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 20-25gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh Animal Model Research Center SCCR Indonesia.

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitain ini adalah mencit C57BL/6 yang diberi paparan UVB 180mJ/cm^2.

4.3.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut

1. Mencit jantan galur C57BL/6
2. Umur 2-3 bulan.
3. Mendapatkan paparan UVB
4. Tikus sehat dan aktif selama masa aklimatisasi
5. Berat badan 20-25 gram.

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Mencit jantan galur C57BL/6r dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.2.3 Kriteria *Drop Out*

Mencit yang masuk kriteria *drop out* pada peneitian ini adalah Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Mencit jantan galur C57BL/6J dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok 1 mencit sehat tanpa paparan UVB, Kelompok 2 kontrol negatif mencit dengan dengan paparan UVB), kelompok 3 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µL dan vitamin C 1,26µL, kelompok 4 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan exosome 42µL, kelompok 5 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µL + vitamin C 1,26µL dan perlakuan exosome 42µL.

4.3.4. Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung berdasarkan sampel eksperimental dari Frederer. Rumus Frederer yaitu: (t-1) (n-1) ≥ 15, dari rumus tersebut didapat hasil n adalah 6. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan yaitu 4 dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan. Sehingga sampel yang digunakan adalah 6 ekor per kelompok kemudian diambil secara acak. Dibagi menjadi 5 kelompok sehingga jumlahnya adalah 30 ekor tikus ditambah cadangan 5 ekor menjadi total 35 ekor.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain, UV chamber, pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 m, sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL.

Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain microplate reader, mikroskop, staining jar, coated desk glass, cover glass, dan laptop

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan untuk perlakuan seperti water base gel, ketamin, xylazine, etanol, akuades, pakan tikus, dan chloroform.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Permohonan *ethical clearence* penelitian diajukan kepada komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

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

1. *Umbilical cord* yang telah dipisahkan dari pembuluh darah diletakkan ke petri dish dan dicuci sampai bersih menggunakan PBS
2. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 75T secara merata dan diamkan selama 3 menit dalam inkubator hingga umbilical cord melekat pada permukaan flask.
3. Medium kultur yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
4. Umbilical cord diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37□C dan 5% CO2.
5. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang sebagian medium dan diganti dengan medium kultur baru.
6. Sel akan muncul setelah kurang lebih 3 hari dari awal proses kultur dan dapat dipanen setelah 14 hari
7. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai kerapatan 80%.

Proses Hypoxia

1. MSC yang telah mencapai kerapatan 80% dimasukkan ke dalam hypoxia chamber

2. Gas nitrogen dimasukkan melalui katup inlet hingga indicator kadar O2 dalam hypoxia chamber menunjukkan konsentrasi 5%.
3. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 370C.
4. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan S-MSCH yang selanjutnya dicampurkan dengan gel berbasis air dengan dosis 5% (P1) dan 10% (P2).

Pembuatan sediaan injeksi exosome

Pembuatan sediaan injeksi dilakukan dengan cara mengambil cairan exosome sesuai dosis menggunakan spuit 1cc.

4.5.3. Penetapan Dosis

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu ditentukan dosis yang akan digunakan untuk penelitian. Rekomendasi maksimum untuk perlakuan subcutan pada mencit adalah 0,25ml, perlakuan dosis kombinasi jika dijumlahkan yaitu glutation 6,24 µL + vitamin C 1,26 µL dan perlakuan injeksi exosome 42 µL, Total Volume Dosis yaitu 49,5 µL.

Penelitian sebelumnya menggunakan exosome sebanyak 300ul untuk injeksi subcutan pada tikus yang dikonversi pada mencit (x 0,14) sehingga menjadi 42µL yang diinjeksikan secara subcutan pada kulit yang terpapar UVB.

Dosis Glutathione digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya, dimana penggunaan glutathione yang dikombinasikan dengan mekobalamin dalam pencegahan dan pengobatan *Peripheral Nerve* (PN) pada pasien *Molecular Mass* (MM), Pasien dalam kelompok penelitian diberikan 2,4 g glutathione secara intravena yang dikonversi ke dosis mencit (x 0,0026), sehingga didapat dosis glutathione adalah 6,24 µL/20gBB mencit.[60] Penelitian terdahulu menggunakan tikus Wistar Kelompok perlakuan diberi suntikan vitamin C subkutan disekitar luka insisi dermal sebanyak 9 mg (0,09ml), Vitamin C dengan dosis 9mg pada tikus dikonversi ke mencit (0,14) sehingga didapat dosis vitamin C 1,26µL/20gBB mencit.[68]

4.5.4. Paparan UV-B

1. Mencit di adaptasikan selama 7 hari
2. Setelah itu seluruh mencit di randomisasi dan di bagi menjadi 4 kelompok
3. Mencit di buat sedasi, dilakukan di infeksi terlebih dahulu dengan alkohol swab pada perut kiri bawah mencit, kemudian injeksi 0,5 cc ketamine 90% + xylasine 10%di bagian Intraperitoneal tikus
4. Cukur bagian punggung mencit selebar 2x2cm, tunggu mencit sampai terbebas dari efek sersedasi
5. Mencit dipapar UVB 180mJ/cm^2 di dalam UV chamber selama 10 menit, enam kali dalam dua minggu.

6. Seluruh mencit di masukkan ke kandang sesuai kelompok, di biarkan tanpa perlakuan dan di beri pakan standar selama 24 jam
7. Validasi dilakukan dihari ke-15 untuk dilakukan pewarnaan *Masson Fontana*

4.5.5. Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Jaringan

Mencit setelah 24 jam pemberian perlakuan terakhir dimatikan dengan cara servikal dislokasi untuk proses pengambilan jaringan. Jaringan kulit diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang diinduksi. Sampel jaringan kulit dipreservasi dalam larutan RNA later untuk mempertahankan kualitas RNA. Sampel kulit dalam RNA disimpan dalam suhu -20^{o}C hingga proses analisis PCR dilakukan.

4.5.6. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

- Sampel kulit sebanyak 100 mg kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang terlah terisi 50 mL RNA Iso Plus. Potongan kulit ditumbuk menggunakan micropastle dan ditambahkan lagi RNAIso Plus sebanyak 50 mL dan disimpan disuhu ruang selama 5 menit. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
- Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 400C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas

berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.

- Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
- Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 400C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.
- Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan (*Diethylpyrocarbonate*) DEPC lalu bolak- balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 400C.
- Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50 µm. Campuran diinkubasi pada suhu 550C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -800C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 ng.
- Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 µL OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10 µL, kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 700C.

- Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 µL, DEPC-Treated H2O 5 µL, ReverTraAce 1 µL. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 250C selama 5 menit, 420C selama 50 menit dan 850C selama 5 menit.

4.5.7. Metode validasi pewarnaan *Masson Fontana*

Pembuatan preparat jaringan dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Jawa Tengah. Validasi dilakukan dihari ke-15, pengecatan melanin dilakukan dengan menggunakan protokol pewarnaan *Masson Fontana* dengan tahapan:

- Pertama deparafinisasi slide jaringan dengan pemanasan cairan bouin ke 54-64ºC.
- Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit,
- Inkubasi slide di hematigoksin besi weigert selama 5 menit.
- Inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit dan
- Inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/ fosfotungstat selama 10-15 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit.
- Inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit dan diamati di bawah mikroskop.

- Peningkatan jumlah melanin secara signifkan di bandingkan kelompok sehat yang di tandai dengan munculnya warna kehitaman pada bagian epidermis.[69]

4.5.8 Pembacaan IFN-γ dan CD68 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

- Ekspresi gen IFN-γ dan gen CD68 dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)
- Campuran dari 3 µL cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer, dan MgCl2) sebanyak 12,5 µL, primer spesifik sebanyak 0,6 µL untuk primer forward dan reverse dan 8,3 µL Nuclease Free Water
- Primer INF-y yang digunakan adalah

  F: 5’ TGGAGATGACACCAAGCTCCAG

  R: 5’ GICTCGGAGCGGATGAAGGTAA

  Primer housekeeping

  Primer GADPH,

  F: 5’ ACTCCACTCACGGCAAATTC

  R: 5’ TCTCCATGGTGGTGAAGACA

  Primer β actin,

  F: 5’ CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG

  R: 5’ TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG
- PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT- PCR illumine

- Peningkatan ekspresi INF-y dan gen CD68 dianalisis dalam ratio peningkatan terhadap house keeping gen dengan mengunakan software EcoStudy.

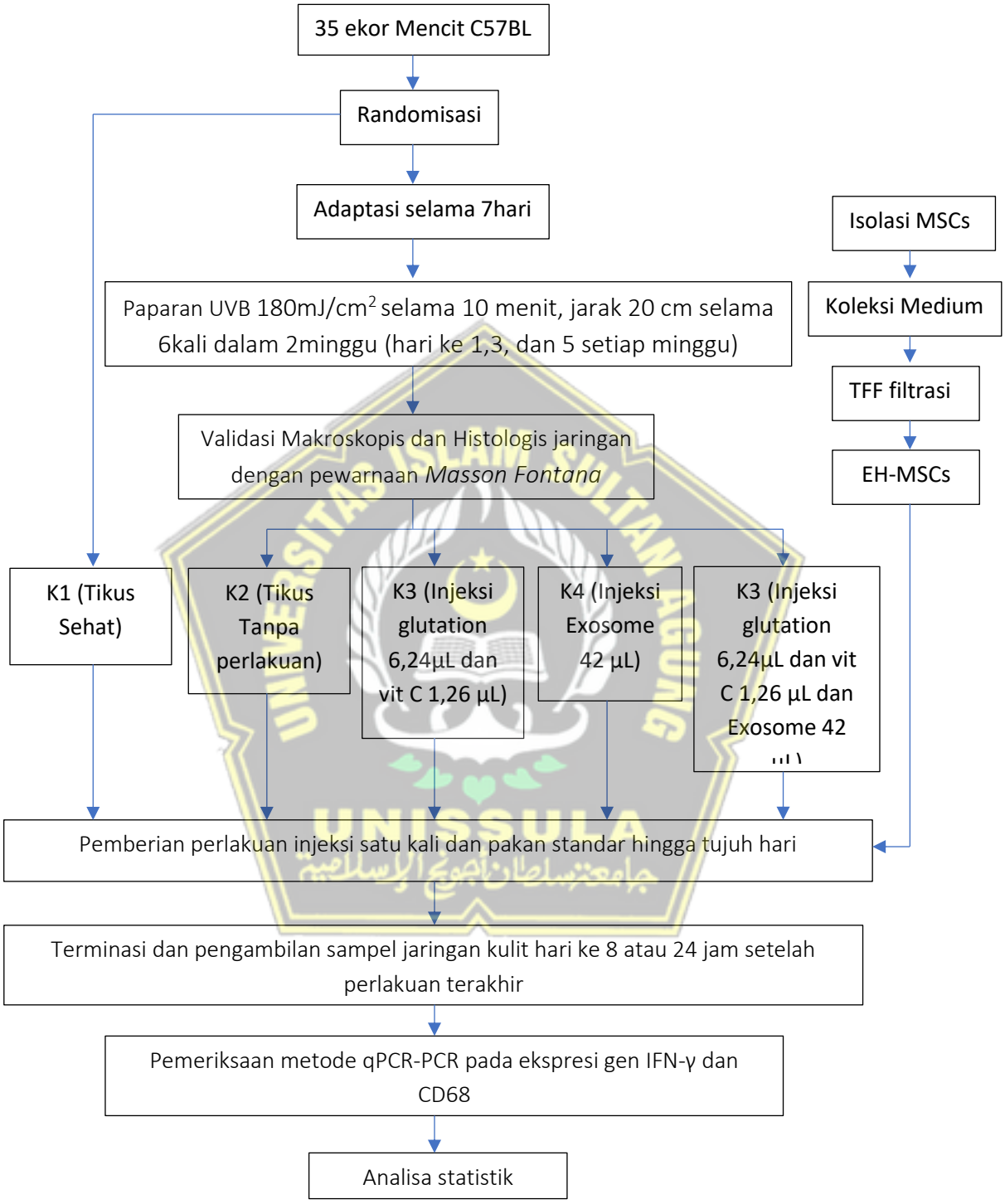
4.6. Tempat dan Waktu Peneltian

Penelitian dilakukan di laboratorium Animal Model Research Center SCCR Indonesia. Penelitian ini dilakukan pada bulan September-Desember 2024.

4.7. Analisa Data

Data dianalisis menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas. Data yang dihasilkan pada ekspresi gen IFN-γ didnoapatkan rmal dan tidak homogen (P>0,05), sehingga dilakukan uji beda uji *One Way Anova* yang menujukkan signifikan (P<0,05) dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui perbedaan antar dua kelompok. Hasil data pada Ekspresi gen CD68 diperoleh tidak normal dan tidak homogen, sehingga dilakukan uji *Kruskal Wallis* (P<0,05) dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar dua kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB V
HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuan dari penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Semarang, selama bulan November- Desember 2024.

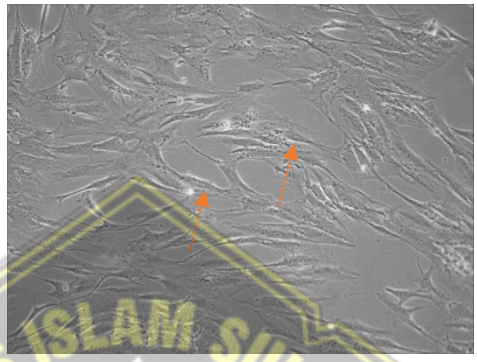
Subjek pada penelitian adalah mencit jantan galur C57BL/6 berjumlah 35 ekor mencit yang dibagi menjadi 5 kelompok, Kelompok (K1) mencit sehat tanpa paparan UVB, kelompok (K2) kontrol negatif mencit dengan paparan UVB tanpa perlakuan, Kelompok perlakuan 1 (K3) mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µL dan vitamin C 1,26µL, kelompok perlakuan 2 (K4) mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi exosome dosis 42 µL, dan kelompok perlakuan 3 (K5) mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24 µL + vitamin C 1,26 µL dan perlakuan injeksi exosome 42 µL.

5.1 HASIL PENELITIAN

5.1.1 Hasil validasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSCs)

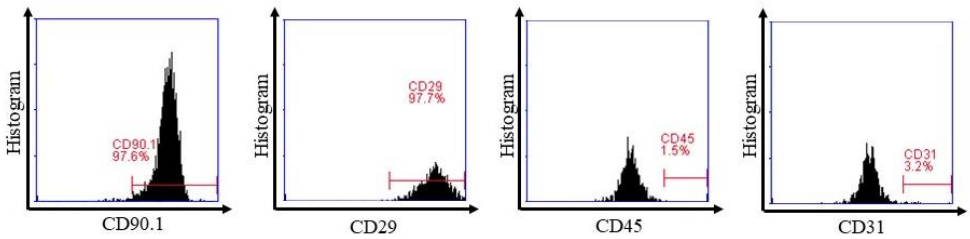
MSCs yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari tali pusat mencit bunting dan diisolasi di Laboratorium SCCR. Selanjutnya, hasil isolasi ini dikultur pada flask plastik yang telah dilengkapi dengan

medium khusus. Setelah mencapai pasase ke-5, hasil kultur MSCs menunjukkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi yang menyerupai sel berbentuk *spindle-like cell* saat diamati di bawah mikroskop, ditunjukkan pada gambar 5.1.



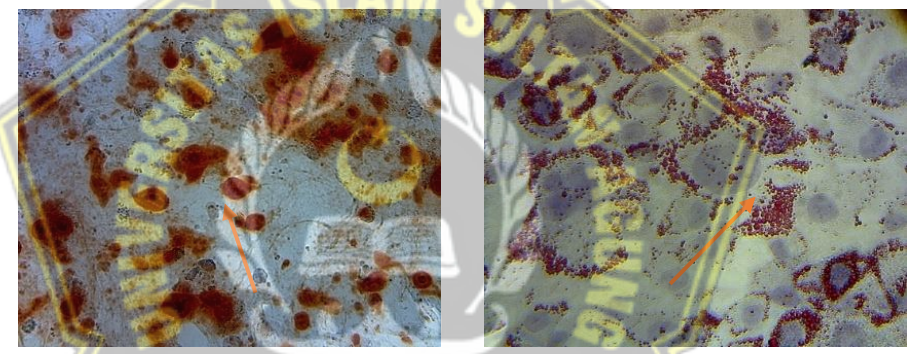
Gambar 5.1 hasil kultur MSCs sel berbentuk *spindle-like* dengan pembesaran 100x.

Validasi isolasi MSCs diperiksa melalui penggunaan flow cytometry untuk menguji kemampuan MSCs dalam mengungkapkan berbagai penanda permukaan yang khusus. Temuan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs mampu mengekpresikan CD90,1 sebanyak 97,6%, CD29 sebanyak 97,7%, sementara CD45 hanya diekspresikan sekitar 1,5%, dan CD31 sekitar 3,2%, seperti pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Analisis Flow cytrometry terhadap ekspresi CD90.1 , CD29, CD45 dan CD31

Penelitian ini juga memvalidasi kemampuan MSCs untuk mengalami diferensiasi menjadi jenis sel dewasa yang berbeda. MSCs diberi medium yang dirancang khusus untuk memfasilitasi diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MSCs mampu mengalami diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit, yang dapat diidentifikasi melalui endapan kalsium serta pengamatan adanya lemak berwarna merah dalam pewarnaan *Alizarin Red* dan pewarnaan *oil Red dye* pada masing-masing kultur osteogenik dan adipogenik.



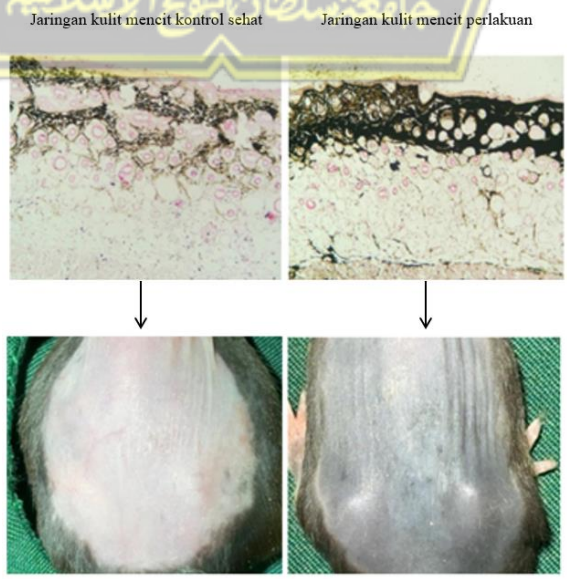
Gambar 5.3 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit (kiri) dan (kanan) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red* pada pembesaran 100x (ditunjukan dengan panah orange)

Sel MSCs dilakukan inkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi O_2 5% selama 24 jam menggunakan hipoksia chamber. Media kultur MSCs yang mengandung *secretome* kemudian difiltrasi mengunakan metode TFF (*Tangential Flow Filtration*) berdasarkan *molecular weight cut-off* didapat molekul berukuran 100-500 kDa yang mengandung exosome. [6,36,70] Selanjutnya MSCs-Exosome Hipoksia divalidasi menggunakan *flowcytometry* untuk memastikan bahwa sel

yang ter-filtrasi mengandung marker exosome caranya dengan melihat kuantifikasi marker exosome yang terbaca yaitu CD63, CD81, dan CD9. Hasilnya, jumlah exosome yang terbaca dalam analisis*flowcytometry* menggunakan marker CD81, CD63 dan CD9 positif adalah 9.1%.

5.1.2 Validasi pada jaringan kulit mencit C57BL model hiperpigmentasi

Validasi jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi dilakukan secara makroskopis dengan mengamati perubahan warna kulit secara visual (foto) setelah paparan UVB dan secara mikroskopis dengan pengecatan *Masson fontana* yang secara spesifik mengidentifikasi melanin dalam jaringan kulit yang memberikan informasi tentang distribusi dan akumulasi melanin pada kondisi hiperpigmentasi akan tampak sebagai granula hitam pada sel kulit, terutama di lapisan basal epidermis dan intensitas pewarnaan menunjukkan tingkat produksi dan distribusi melanin. Hasil analisis makroskopis dan mikroskopis pengecatan *Masson fontana* pada jaringan kulit mencit sebagai berikut:



Gambar 5.4 Validasi jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi

5.1.3 Efek injeksi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68

Pada penelitian ini didapatkan hasil analisis kombinasi injeksi EH-MSC dan glutation dengan vitamin C lebih rendah terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi. Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.2. Rata rata ekspresi gen IFN-γ dan CD68 paling rendah pada kelompok K5 dengan nilai IFN-γ 0,41± 0,19 IFNγ mRNA *relative expression* dan ekspresi gen CD68 0,50 ± 0,13 CD68 mRNA *relative expression.*

Tabel 5. 1 Data hasil analisis statistik ekspresi gen IFN-γ dan CD68

Variabel	**Kelompok**					***p***
	K1 Rerata ±SD	K2 Rerata ±SD	K3 Rerata±SD	K4 Rerata±SD	K5 Rerata±SD	
Ekspresi gen IFN-γ (IFNγ mRNA *relative expression)*	1,05 ± 0,27	1,28 ± 0,64	0,56 ± 0,33	0,54 ± 0,28	0,41 ± 0,19	
Saphiro wilk	0,093	0,237	0,057	0,875	0,908	
Levene's Test						0,049
Oneway Anova						0,001
Ekspresi gen CD68 (CD68 mRNA *relative expression)*	1,08 ± 0,23	1,32 ± 0,38	0,63 ± 0,34	0,51 ± 0,19	0,50 ± 0,13	
Saphiro wilk	0,026	0,231	0,266	0,306	0,937	
Levene's Test						0,000
Kruskal Wallis						0,001

Keterangan:

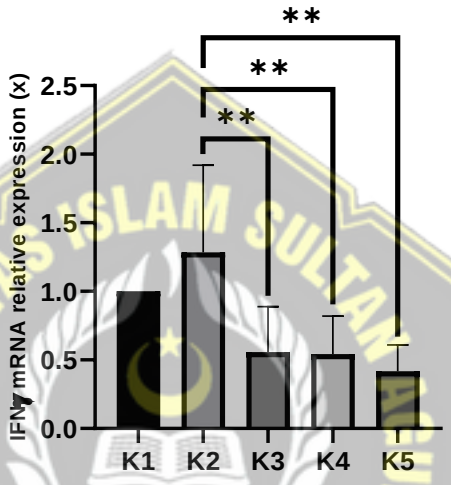
- *Uji Saphiro Wilk* (p > 0,05 = normal)
- *Levene's Test* (p > 0,05 = homogen)
- Oneway Anova (p<0,05) = perbedaan signifikan)
- *Kruskal Wallis* (p<0,05) = perbedaan signifikan)

Hasil ekspresi gen IFN-γ semuanya terdistribusi normal, ditunjukkan oleh nilai p>0,05 yang diperoleh dengan uji *Shapiro Wilk*. Selain itu, varian data tidak homogen dengan hasil uji *Levene's Test* yang ditunjukkan dengan nilai p=0,049 (p>0,05). Distribusi dan varian data ekspresi gen IFN-γ didapatkan normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *One Way Anova* didapatkan nilai p=0,001 (p<0,05) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan signifikan diantara semua kelompok perlakuan. Hasil statistik uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Temhane* untuk perbedaan antar dua kelompok perlakuan.

Hasil ekspresi gen CD68 tidak terdistribusi normal, ditunjukkan pada kelompok K1 *p*=0,026 (*p*>0,05) yang diperoleh dengan uji *Shapiro Wilk*. Selain itu, varian data yang tidak homogen dengan hasil uji *Levene's Test* yang ditunjukkan dengan nilai p=0,000 (p>0,05). Distribusi dan varian data ekspresi gen CD68 didapatkan tidak normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai p=0,001 (p<0,05) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan signifikan antar semua kelompok. Hasil statistik uji uji *Kruskal Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar dua kelompok.

5.1.3.1 Ekspesi gen IFN-γ

Pada penelitian ini di dapatkan rata rata ekspresi gen IFN-γ paling tinggi pada kelompok K2 1,28±0,64, pada kelompok K3 lebih rendah dengan nilai 0,56 ± 0,33 dan kelompok K4 dengan nilai 0,54 ± 0,28, dan ekspresi gen IFN-γ paling rendah pada kelompok K5 0,42 ± 0,19 (gambar 5.4).



Gambar 5.5 Grafik Ekspresi gen IFN-γ pada tiap kelompok penelitian

Hasil statistik parametrik uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Temhane* untuk melihat perbedaan atar dua kelompok perlakuan. Dari analisis tabel 5.2 menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok K2, dengan kelompok K3, K4 dan K5.

Tabel 5.2 Uji Post Hoc Temhane ekspresi IFN-γ pada tiap kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
K1	K2	0,278
	K3	*0,022
		*0,019

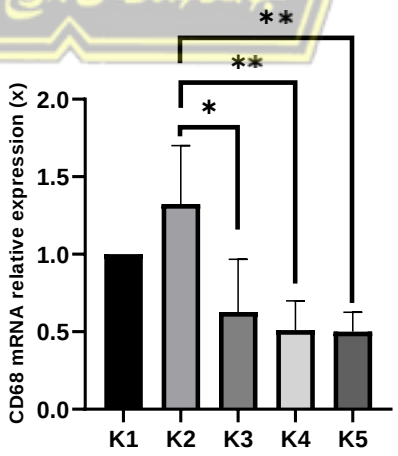
	K4	*0,004
	K5	0,279
K2	K3	*0.002
	K4	*0.001
	K5	*0,001
K3	K4	0.936
	K5	0.544
K4	K5	0,541

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Hasil penelitian dapat diambil kesimpulan ekspresi gen IFN-γ lebih rendah pada kelompok dosis kombinasi (K5) dibandingkan dengan kelompok K2, ekspresi gen IFN-γ yang rendah tidak berbeda bermakna dengan kelompok K4 maupun K3.

5.1.3.2 Ekspesi gen CD68

Hasil penelitian didapatkan rata rata ekspresi gen CD68 paling tinggi pada kelompok K2 1,32± 0,38, ekspresi CD68 lebih rendah pada kelompok K3 sebesar 0,63±0,34, kelompok K4 dengan nilai 0,51±0,19, dan kelompok K5 ekspresi gen CD68 paling rendah 0,50±0,13 (gambar 5.6).



Gambar 5.6 Grafik Ekspresi gen CD68 pada tiap kelompok perlakuan

Hasil statistik uji *Kruskal Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar dua kelompok, dari analisis tabel 5.3.

Tabel 5.3 Uji *Mann-Whitney* CD68 pada masing-masing kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
K1	K2	0,334
	K3	0,053
	K4	0,004
	K5	0,004
K2	K3	*0.016
	K4	*0.004
	K5	*0,004
K3	K4	0.522
	K5	0.749
K4	K5	9,936

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Pada penelitian ini didapatkan hasil ekspresi gen CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi paling rendah pada dosis kombinasi kelompok K5, hasil lebih rendah menunjukkan perbedaan tidak bermakna dengan kelompok K4 maupun kelompok K3.

5.2 PEMBAHASAN

Penelitian ini menganalisis injeksi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSCs) yang dikombinasi glutathione dengan vitamin C pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang berfokus pada ekspresi gen IFN-γ dan CD68. Kombinasi injeksi menunjukkan pengaruh terhadap penurunan ekspresi gen IFN-γ dan CD68. Potensi injeksi EH-MSCs secara subkutan dapat

memperbaiki inflamasi kronis yang memicu hiperpigmentasi dan meningkatkan kapasitas penyembuhan kulit.

Hasil penelitian menunjukkan kelompok K5 ekspresi gen IFN-γ dan CD68 lebih rendah dibandingkan kelompok K4, lebih rendah dari kelompok K3, namun tidak berbeda bermakna. Eksosom dari MSC dapat meningkatkan produksi sitokin anti-inflamasi (misalnya, IL-10) dan menekan produksi sitokin pro-inflamasi seperti IFN-γ. Misalnya, eksosom yang berasal dari MSC telah diamati menghambat aktivasi dan proliferasi sel T, yang merupakan proses utama dalam produksi IFN-γ. Selain itu, eksosom memodulasi polarisasi makrofag, mendorong transisi ke fenotipe M2 anti-inflamasi yang selanjutnya mengurangi kadar IFN-γ dan peradangan pada jaringan.[71] Penelitian melaporkan bahwa eksosom meningkatkan perbaikan kulit dan memodulasi peradangan dengan mengatur lingkungan mikro imun. Misalnya, eksosom yang berasal dari sel punca mesenkimal yang dikondisikan sebelumnya dengan hipoksia terbukti meningkatkan perbaikan jaringan dengan memodulasi aktivitas makrofag dan mengurangi respons peradangan yang disebabkan oleh paparan sinar UV atau stresor lainnya. Temuan ini menunjukkan potensi manfaat terapi berbasis eksosom dalam mengelola hiperpigmentasi dan kerusakan kulit akibat sinar UV, sebagian melalui mekanisme yang melibatkan penurunan regulasi penanda inflamasi seperti CD68.[72,73]

Metode injeksi subkutan ini memastikan distribusi terapi langsung ke lapisan dermis, target utama dalam pengobatan hiperpigmentasi. Antioksidan mengurangi stres oksidatif pada jaringan kulit. Menurunkan inflamasi dan

meningkatkan penyembuhan kulit dan regenerasi jaringan melalui eksosom.[2,74] Kondisi hipoksia meningkatkan potensi eksosom dengan menambah kandungan faktor pro-angiogenik dan antioksidan.[75] Eksosom mengandung mikroRNA dengan ekspresi penanda permukaan CD seperti CD44+, CD73+, CD90+, dan CD105+, dan protein yang memodulasi respons inflamasi dan imun, mengurangi stres oksidatif dan inflamasi dengan mengubah aktivitas sel imun seperti makrofag, aktivasi makrofag yang diekspresikan oleh CD68 menandakan proses inflamasi aktif, penurunan ekspresi CD68 memberikan efek percepatan dalam remodeling dan perbaikan jaringan, yang dapat mempengaruhi berbagai jenis sel di kulit dan jaringan sekitarnya.[25] Eksosom menekan mediator pro-inflamasi dan meningkatkan jalur anti-inflamasi, yang menekan ekspresi IFN-γ. mikroRNA seperti miR-146a dalam eksosom dapat menurunkan regulasi jalur seperti NF-κB, yang merupakan kunci dalam respons inflamasi. [5]

Kondisi hipoksia pada MSC meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 sebagai molekul kecil dan ekspresi berbagai antioksidan seperti GPX, superoksida dismutase (SOD)1, SOD2, katalase (CAT), dan sirtuin (SIRT)1 dan 3 yang terakumulasi dalam eksosom. Produksi IL-10 oleh MSC dapat menghambat NF-κB yang memicu peningkatan ROS. Selain itu, antioksidan yang diekspresikan langsung oleh MSC melalui eksosom, seperti GPX, dapat mengaktivasi Nrf2 yang meningkatkan ekspresi antioksidan. Selain itu, berbagai miRNA dalam eksosom MSC hipoksia, seperti miR-21, miR-22-3p, dan miR-215-5p, juga berperan dalam menghambat stres oksidatif.[43] miRNA menurunkan regulasi gen proinflamasi dan sintesis melanin sekaligus

meningkatkan jalur perbaikan. Misalnya, mereka dapat menargetkan MITF, faktor transkripsi yang menjadi pusat melanogenesis, sehingga mengurangi produksi melanin dan hiperpigmentasi.

Aktivasi NF-κB terjadi ketika ada kondisi proinflamasi yang memicu pelepasan dan pergerakan NF-κB dari kompleks IKK menuju nukleus. Menyebabkan peningkatan ekspresi molekul pro-inflamasi, NF-κB berperan dalam menginduksi ekspresi sejumlah gen pro-inflamasi, Saat jalur NF-κB diaktifkan, akan memicu transkripsi gen-gen target seperti IL-1β, IL-6, dan TNF-α.[40] Eksosome mengaktifkan jalur STAT3 melalui translokasi JAK-1 dari membrane intraseluler menuju sitoplasma. Hal ini berdampak pada fosforilasi STAT3 dan translokasinya menuju nukleus. Translokasi STAT3 menuju nukleus dapat mengaktivasi gen SOCS3 untuk selanjutnya disintesis menjadi protein yang dilepaskan menuju sitoplasma. Ekspresi SOCS3 pada sitoplasma menghambat jalur pensinyalan intraseluler IKK sehingga mencegah translokasi NF-κβ ke nukleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen pro-inflamasi. Melalui sintesis SOCS3 dan penghambatan NF-kB, IL-10 dapat menekan ekspresi berbagai molekul pro-inflamasi, termasuk sitokin IFN-γ.[39-41]

Vitamin C membantu regenerasi glutathione dalam tubuh, berfungsi sebagai antioksidan, dan memiliki efek pemutih kulit dengan menghambat produksi melanin.[57] Glutathione dapat menurunkan produksi melanin melalui penghambatan enzim tirosinase, sehingga mengurangi hiperpigmentasi.[76] Glutathione dan Vitamin C secara sinergis menetralkan ROS dan mengurangi stres oksidatif pada lingkungan kulit yang mengalami hiperpigmentasi, dengan

memulihkan keseimbangan redoks, kombinasi ini dapat mengurangi aktivasi mediator inflamasi dan selanjutnya mengatur sitokin seperti IFN-γ, yang terlibat dalam respons imun dan pengendalian pigmentasi. Dampak Anti-inflamasi dikaitkan dengan pergeseran populasi makrofag menuju fenotipe M2, yang bersifat anti-inflamasi dan dapat menekan sitokin pro-inflamasi seperti IFN-γ. Pergeseran ini sangat penting dalam hiperpigmentasi, di mana peradangan dapat memperburuk produksi melanin. Mekanisme gabungan ini menunjukkan pendekatan multi-aspek untuk mengurangi hiperpigmentasi dengan memodulasi respons imun dan stres oksidatif.[77] Penurunan ekspresi IFN-γ penting dalam memperbaiki kondisi kulit yang terkait dengan ketidakteraturan pigmentasi.[77–79]

Hasil perbandingan ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kelompok tikus sehat K1 dangan kelompok yang dipapar UVB K2 menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna, ekspresi gen diukur pada waktu yang kurang optimal, terlalu lama setelah 7 hari paparan UVB, maka perubahan ekspresi IFN-γ dan CD68 sudah kembali ke kondisi basal, sehingga perbedaan dengan kelompok kontrol sehat menjadi tidak bermakna. Waktu pengukuran ekspresi gen sangat mempengaruhi hasil penelitian. Jika pemeriksaan dilakukan lebih cepat, misalnya dalam 24-48 jam setelah paparan UVB, perubahan ekspresi IFN-γ dan CD68 kemungkinan akan lebih nyata, mencerminkan respons peradangan akut yang sedang berlangsung. Sebaliknya, jika pengukuran dilakukan terlalu lama setelah paparan, ekspresi gen mungkin telah kembali ke level normal, sehingga tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Jika setelah perlakuan awal dilanjutkan dengan paparan UVB tambahan, ekspresi

IFN-γ dan CD68 dapat meningkat sebagai respons terhadap stres oksidatif dan peradangan. Namun, jika paparan berlangsung lebih lama, sel-sel dapat mengalami adaptasi atau toleransi, yang menyebabkan ekspresi gen kembali menurun. Jika terjadi kerusakan jaringan kronis, ekspresi IFN-γ dan CD68 mungkin tetap tinggi, mencerminkan peradangan persisten dan infiltrasi makrofag yang berkelanjutan.

Hasil perbandingan kelompok K3 glutation dan vitamin C, K4 *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* dan K5 kombinasi EH-MSC, glutation dan vitamin C menjadi lebih rendah dibandingkan kelompok sehat dapat mengganggu respons imun terhadap infeksi, terutama terhadap patogen intraseluler, serta melemahkan fungsi makrofag dalam fagositosis dan perbaikan jaringan. Selain itu, berkurangnya ekspresi IFN-γ juga dapat menurunkan kemampuan tubuh dalam melawan kanker melalui mekanisme imunosurveillance. Meskipun penurunan inflamasi bermanfaat dalam mengurangi kerusakan jaringan akibat paparan UVB, pengurangan berlebihan dari kedua molekul ini dapat menyebabkan gangguan imunitas terhadap patogen serta menghambat keseimbangan inflamasi yang diperlukan untuk regenerasi jaringan. Oleh karena itu, terapi berbasis eksosom dan antioksidan harus dioptimalkan agar tetap mempertahankan respons imun yang seimbang, bukan hanya sekadar menekan inflamasi secara berlebihan. Penelitian ini tidak melakukan pengamatan histologi jaringan kulit, sebagai pembanding untuk memahami perubahan struktural yang terjadi akibat perlakuan atau efek paparan, terapi, serta memastikan keakuratan dan validitas hasil penelitian.

BAB VI

KESIMPULAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

6.1.1 Terdapat pengaruh kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC), glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

6.1.2 Pemberian kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC), glutathione dan vitamin berpengaruh menurunkan ekspresi gen IFN-γ

6.1.3 Pemberian kombinasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutathione dan vitamin C berpengaruh menurunkan ekspresi gen CD68

6.2 Saran

Saran untuk penelitian berikutnya antara lain:

6.2.1 Penelitian selanjutnya menaganalisis ekspresi IFN-γ dan CD68 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi lebih cepat dalam fase akut setelah paparan UVB.

6.2.2 Melakukan penelitian dengan perlakuan paparan UVB pada awal pengkondisian hiperpigmentasi dilanjutkan dengan paparan UVB tambahan hingga hari ke 7 setelah dilakukan terapi injeksi, ekspresi IFN-γ dan CD68 mungkin tetap tinggi, mencerminkan peradangan

persisten dan infiltrasi makrofag yang berkelanjutan.

6.2.3 Menambahkan analisis histologi jaringan kulit untuk mengamati perubahan struktural yang terjadi akibat perlakuan atau efek paparan dan terapi yang diberikan.

6.2.4 Menyesuaikan dosis terapi kombinasi lebih tepat lagi agar pengobatan tetap dalam jendela terapeutik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wang XY, Guan XH, Yu ZP, et al. Human amniotic stem cells-derived exosmal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-021-02570-9

2. Lee JM, Lee JO, Kim Y, et al. Anti-melanogenic effect of exosomes derived from human dermal fibroblasts (BJ-5ta-Ex) in C57BL/6 mice and B16F10 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2024;37(2):232-246. doi:10.1111/pcmr.13135

3. Li Y, Zhang J, Shi J, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells attenuate hypertrophic scar fibrosis by miR-192-5p/IL-17RA/Smad axis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-021-02290-0

4. Prakoeswa CRS, Pratiwi FD, Herwanto N, et al. The effects of amniotic membrane stem cell-conditioned medium on photoaging. *Journal of Dermatological Treatment*. 2019;30(5):478-482. doi:10.1080/09546634.2018.1530438

5. Lu W, Zhang J, Wu Y, Sun W, Jiang Z, Luo X. Engineered NF-κB siRNA-encapsulating exosomes as a modality for therapy of skin lesions. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1109381

6. Hu JC, Zheng CX, Sui BD, Liu WJ, Jin Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel and potential remedy for cutaneous wound healing and regeneration. *World J Stem Cells*. 2022;14(5):318-329. doi:10.4252/wjsc.v14.i5.318

7. Putri Brillian Betrista Viorizka, Trisniartami Setyaningrum, Ema Qurnianingsih, Damayanti. The Profile and Triggering Factors of Melasma Patients: A Retrospective Study. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin*. 2023;35(2):142-147. doi:10.20473/bikk.v35.2.2023.142-147

8. Guan LL, Lim HW, Mohammad TF. Sunscreens and Photoaging: A Review of Current Literature. *Am J Clin Dermatol*. 2021;22(6):819-828. doi:10.1007/s40257-021-00632-5

9. Kim MR, Lee HS, Choi HS, Kim SY, Park Y, Suh HJ. Protective effects of ginseng leaf extract using enzymatic extraction against oxidative damage of

UVA-irradiated human keratinocytes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(4):933-945. doi:10.1007/s12010-014-0886-2

10. Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci*. 2018;210:201-208. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.056

11. Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ, Chiang HM. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3β-ol, Isolated from Antrodia camphorata, on Hairless mouse skin. *Molecules*. 2016;21(9). doi:10.3390/molecules21091213

12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442

13. Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, D'Alcontres FS. ROS as Regulators of Cellular Processes in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/1208690

14. Xia X, Chiu PWY, Lam PK, Chin WC, Ng EKW, Lau JYW. Secretome from hypoxia-conditioned adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the healing of gastric mucosal injury in a rodent model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(1):178-188. doi:10.1016/j.bbadis.2017.10.009

15. Jahandideh S, Khatami S, Eslami Far A, Kadivar M. Anti-inflammatory effects of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells secretome preconditioned with diazoxide, trimetazidine and MG-132 on LPS-induced systemic inflammation mouse model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup2):1178-1187. doi:10.1080/21691401.2018.1481862

16. Kim YW, Byzova T V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. Published online 2014. doi:10.1182/blood

17. Oh JE, Kim MS, Jeon WK, et al. A nuclear factor kappa B-derived inhibitor tripeptide inhibits UVB-induced photoaging process. *J Dermatol Sci*. 2014;76(3):196-205. doi:10.1016/j.jdermsci.2014.10.002

18. Chen S, He Z, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in photoaging: basic science and literature review. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1-15. doi:10.1186/s13287-020-01994-z

19. Balasubramanian S, Thej C, Walvekar A, et al. Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow

Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2017;07(01):99-117. doi:10.4236/jcdsa.2017.71010

20. Kim YJ, Seo DH, Lee SH, et al. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochem Biophys Rep*. 2018;16:96-102. doi:10.1016/j.bbrep.2018.10.007

21. Robert AW, Azevedo Gomes F, Rode MP, et al. The skin regeneration potential of a pro-angiogenic secretome from human skin-derived multipotent stromal cells. *J Tissue Eng*. 2019;10. doi:10.1177/2041731419833391

22. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina*. 2019;38(3):164-171. doi:10.18051/univmed.2019.v38.164-171

23. Li L, Ngo HTT, Hwang E, et al. Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents uvb-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2020;21(1). doi:10.3390/ijms21010049

24. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2. doi:10.1038/sigtrans.2017.23

25. Yao C, Lee DH, Oh JH, et al. Poly(I : C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2015;80(1):54-60. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.06.017

26. Kuo YH, Chen CW, Chu Y, Lin P, Chiang HM. In vitro and in vivo studies on protective action of N-phenethyl caffeamide against photodamage of skin. *PLoS One*. 2015;10(9). doi:10.1371/journal.pone.0136777

27. Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, et al. Interleukin-6: Molecule in the intersection of cancer, ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):1-25. doi:10.3390/ijms21217937

28. Tampa M, Neagu M, Caruntu C, Constantin C, Georgescu SR. Skin Inflammation—A Cornerstone in Dermatological Conditions. *J Pers Med*. 2022;12(9):10-13. doi:10.3390/jpm12091370

29. Yusharyahya SN. Mekanisme Penuaan Kulit sebagai Dasar Pencegahan dan Pengobatan Kulit Menua. *eJournal Kedokteran Indonesia*. 2021;9(2):150. doi:10.23886/ejki.9.49.150

30. Ahmad Z, Damayanti. Penuaan Kulit : Patofisiologi dan Manifestasi Klinis. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin – Periodical of Dermatology and Venereology*. 2018;30(03):208-215. http://download.garuda.ristekdikti.go.id/article.php?article=850430&val=7405&title=Penuaan Kulit: Patofisiologi dan Manifestasi Klinis

31. Ain QU, Sarfraz M, Prasesti GK, Dewi TI, Kurniati NF. Confounders in identification and analysis of inflammatory biomarkers in cardiovascular diseases. *Biomolecules*. 2021;11(10):1-17. doi:10.3390/biom11101464

32. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich spatholobus suberectus stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients*. 2019;11(6). doi:10.3390/nu11061341

33. Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol*. 2019;28(October 2018):23-27. doi:10.1111/exd.13818

34. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1):1-14. doi:10.1101/cshperspect.a015370

35. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(10):924-931. doi:10.2340/00015555-3002

36. Wang T, Jian Z, Baskys A, et al. MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system. *Biomaterials*. 2020;257(April):120264. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120264

37. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, 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(3):305-310. doi:10.3889/oamjms.2019.049

38. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The role of tnf-α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf-β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-1783. doi:10.3889/oamjms.2018.404

39. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep*. 2016;2(2):168-173. doi:10.1007/s40778-016-0044-6

40. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells*. 2019;12(2):218-226. doi:10.15283/ijsc18034

41. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol*. 2019;10(JUN). doi:10.3389/fimmu.2019.01191

42. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

43. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep*. 2016;2(2):168-173. doi:10.1007/s40778-016-0044-6

44. Xiong M, Zhang Q, Hu W, et al. The novel mechanisms and applications of exosomes in dermatology and cutaneous medical aesthetics. *Pharmacol Res*. 2021;166. doi:10.1016/j.phrs.2021.105490

45. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9). doi:10.3390/ijms19092783

46. 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). doi:10.1186/s12967-014-0260-8

47. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells*. 2019;8(5). doi:10.3390/cells8050467

48. Guan L, Suggs A, Galan E, Lam M, Baron ED. Topical application of ST266 reduces UV-induced skin damage. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017;10:459-471. doi:10.2147/CCID.S147112

49. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060868

50. Dunnill C, Patton T, Brennan J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J*. 2017;14(1):89-96. doi:10.1111/iwj.12557

51. Kwon DH, Cha HJ, Lee H, et al. Protective effect of glutathione against oxidative stress-induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-2/heme oxygenase-1 pathway. *Antioxidants*. 2019;8(4). doi:10.3390/antiox8040082

52. Cui X, Mi T, Zhang H, et al. Glutathione amino acid precursors protect skin from UVB-induced damage and improve skin tone. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2024;38(S3):12-20. doi:10.1111/jdv.19718

53. Sinee W, Siriwan T, Phanupong P, Praavit A. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. Published online 2017:147-153.

54. Ulasan S, Mahmood MN, Terapan DK, Terapan FS, Samarra U. Khasiat Glutathione dalam Mencerahkan Kulit : 2022;5(2):5-16.

55. Nazhan Mahmood M. The Effectiveness of Glutathione on Skin Lightening: A Review. *Int J Med Sci*. 2022;5(2):2522-7386. http://doi.org/10.32441.ijms.5.2.2

56. Zheng H, Xu Y, Liehn EA, Rusu M. Vitamin C as Scavenger of Reactive Oxygen Species during Healing after Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci*. 2024;25(6). doi:10.3390/ijms25063114

57. Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, et al. Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-34530-4

58. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid. *Antioxidants*. 2022;11(10). doi:10.3390/antiox11101993

59. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, et al. Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κB/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research*. 2012;32(6):428-438. doi:10.1016/j.nutres.2012.04.005

60. Huang H, Zha M, Liu X, et al. Glutathione combined with mecobalamin in the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a retrospective clinical study. *Ann Palliat Med*. 2021;10(12):12335-12346. doi:10.21037/apm-21-3313

61. Fabian IM, Sinnathamby ES, Flanagan CJ, et al. Topical Hydroquinone for Hyperpigmentation: A Narrative Review. *Cureus*. 2023;15(11). doi:10.7759/cureus.48840

62. Mousavi S, Escher U, Thunhorst E, et al. Vitamin C alleviates acute enterocolitis in Campylobacter jejuni infected mice. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-13. doi:10.1038/s41598-020-59890-8

63. Yi N, Chiang Z. Topical Vitamin C and the Skin. *Jcad Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2017;14(7):14-17.

64. Hanke J. *ROLE OF NFκB AND BCL-2 IN IGFBP-3 MEDIATED INTRINSIC APOPTOSIS*.; 2017.

65. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells*. 2019;12(2):218-226. doi:10.15283/ijsc18034

66. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol*. 2019;10(JUN). doi:10.3389/fimmu.2019.01191

67. Shukla A, Maiti P. Nanomedicine and versatile therapies for cancer treatment. *MedComm (Beijing)*. 2022;3(3). doi:10.1002/mco2.163

68. Darma S, Manjas M, Saputra D, Agus S, . E. Efek Pemberian Suntikan Subkutan Vitamin C Terhadap Luka Insisi Dermal. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2013;2(3):168. doi:10.25077/jka.v2i3.247

69. Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, et al. Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats. *Open Access Maced J Med Sci*. 2022;10(A):1-7. doi:10.3889/oamjms.2022.10348

70. 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;19(6):1-18. doi:10.3390/ijms19061715

71. Tan YL, Al-Masawa ME, Eng SP, Shafiee MN, Law JX, Ng MH. Therapeutic Efficacy of Interferon-Gamma and Hypoxia-Primed Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles: Underlying Mechanisms and Potentials in Clinical Translation. *Biomedicines*. 2024;12(6). doi:10.3390/biomedicines12061369

72. Li D, Li D, Wang Z, et al. Signaling pathways activated and regulated by stem cell-derived exosome therapy. *Cell Biosci*. 2024;14(1):1-26. doi:10.1186/s13578-024-01277-7

73. Tienda-Vázquez MA, Hanel JM, Márquez-Arteaga EM, et al. Exosomes: A Promising Strategy for Repair, Regeneration and Treatment of Skin Disorders. *Cells*. 2023;12(12). doi:10.3390/cells12121625

74. Sasaninia K, Kelley M, Abnousian A, et al. Topical Absorption of Glutathione–Cyclodextrin Nanoparticle Complex in Healthy Human Subjects Improves Immune Response against Mycobacterium avium Infection. *Antioxidants*. 2023;12(7). doi:10.3390/antiox12071375

75. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina*. 2019;38(3):164-171. doi:10.18051/univmed.2019.v38.164-171

76. Petruk G, Giudice R Del, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/1454936

77. Shen J, Bao S, Reeve VE. Modulation of IL-10, IL-12, and IFN-γ in the epidermis of hairless mice by UVA (320-400 nm) and UVB (280-320 nm) radiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999;113(6):1059-1064. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00782.x

78. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci*. 2009;10(9):4066-4087. doi:10.3390/ijms10094066

79. Thawabteh AM, Jibreen A, Karaman D, Thawabteh A, Karaman R. Skin Pigmentation Types, Causes and Treatment—A Review. *Molecules*. 2023;28(12). doi:10.3390/molecules28124839