

PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA (EH-MSCs)*, GLUTATHIONE DAN VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI GEN IL-10 DAN CD-163
(Studi Eksperimental in Vivo Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi)

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2



Wulan Dyah Utami

MBK 222010338

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2025

TESIS

PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA (EH-MSCs)*, GLUTATHIONE DAN VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI GEN IL-10 DAN CD-163 (Studi Eksperimental in Vivo Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi)

disusun oleh:
Wulan Dyah Utami
(MBK 222010338)

yang dipertahankan didepan Tim Penguji
13 Januari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima
Menyetujui:

Pembimbing I



Dr. dr. Adi Muradi Muhar, SpB.SubspBD(K)
NIDN.0007126711

Pembimbing II



Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes
NIDN.0022046101

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 satu 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, 24 Desember 2024



(Wulan Dyah Utami)

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 MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA (EH-MSCs)*, GLUTATHIONE DAN VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI GEN IL-10 DAN CD-163 (Studi Eksperimental in Vivo Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi)” ini dapat terselesaikan. Shalawat dan salam kami sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW, yang selalu menjadi pedoman kami. Laporan 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. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan sebagai penguji I yang telah memberikan banyak masukan kepada penulis.

4. Dr. dr. Adi Muradi Muhar, SpB.SubspBD(K) sebagai dosen pembimbing I yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran serta dukungan untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya tesis ini.
5. Prof. DR.Ir. Titiek Sumarawati, M Kes, sebagai dosen pembimbing II yang sangat baik dan selalu sabar memberikan petunjuk dan selalu mengarahkan penulis hingga terselesaikan tesis ini.
6. Dr.dr. Eko Setiawan, Sp. B dan Dr. dr. Chodidjah, M. Kes sebagai penguji 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. Dan tidak lupa untuk kakak tercinta terimakasih.
9. Suami tercinta rizki haitamy, terimakasih untuk selalu ada dan mendukung. Serta anak kebanggaan mami: chesan dan ghaza, karena dukungan kalian lah, mami bisa berjuang sejauh ini, semoga kelak kalian bisa meraih cita- cita lebih dari yang mami sudah capai saat ini.
10. Seluruh keluarga di Jakarta dan dimedan yang selalu memberikan doanya terimakasih.
11. Segenap staff SCCR (*Stem Cell Cancer Research*) terimakasih banyak atas semua arahannya dan selalu mau direpotin terus.

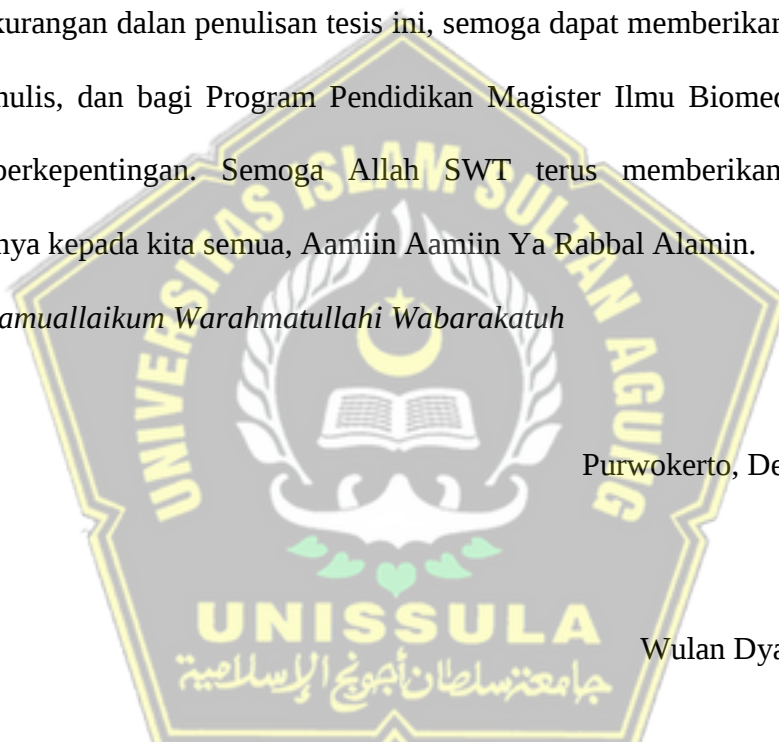
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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 dalam 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.

Wassalamuallaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Purwokerto, Desember 2024

Wulan Dyah Utami



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	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	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. <i>Interleukin-10</i> (IL10).....	9
2.2. CD163.....	10
2.3. Hiperpigmentasi.....	12
2.4. MSCs	15
2.4.1. Fungsi.....	16
2.4.2. Mobilisasi MSC	17

2.4.3. Konsep Small Molecule Growth Factor MSC	18
2.4.4. Induksi Small Molecule dan Exosome MSC	19
2.5. Glutathione dan Vitamin C	21
2.6. Pengaruh Exosome dan Glutathione dengan Vitamin C terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163	22
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	25
3.1. Kerangka Teori	25
3.2. Kerangka Konsep	29
3.3. Hipotesis	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	30
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	31
4.2.1. Variabel Penelitian.....	31
4.2.2. Definisi Operasional.....	31
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	32
4.3.1. Subjek Penelitian.....	32
4.3.2. Sampel Penelitian.....	33
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian	34
4.3.4. Besar Sampel.....	34
4.4. Alat dan Bahan	34
4.4.1. Alat.....	34
4.4.2. Bahan	35
4.5. Cara Penelitian.....	35
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	35
4.5.2. Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> .	35
4.5.3. Penetapan Dosis	37
4.5.4. Paparan UV-B	37
4.5.5. Validasi dengan pewarnaan Masson Fontana untuk Pengecekan jumlah Melanin	38
4.5.6. Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Jaringan.....	39
4.6. Tempat dan Waktu Peneltian.....	39

4.7. Analisa Data	39
4.8. Alur Penelitian.....	40
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	41
5.1. Hasil Penelitian.....	41
5.1.1. Validasi EH-MSCs (<i>Exosome mesenchymal stem cell hypoxia</i>)	41
5.1.2. Validasi makroskopis dan histologi jaringan kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi	44
5.1.3. Hasil analisis ekspresi gen IL-10 dan CD-163 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi	46
5.1.4. Hasil analisis ekspresi CD-163 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi	47
5.2. Pembahasan	50
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	57
6.1. Simpulan.....	57
6.2. Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN.....	67



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 5.1.	Data hasil deskriptif ekspresi IL-10.....	46
Tabel 5.2.	Data hasil deskriptif ekspresi CD-163 dan uji parametrik <i>One way anova</i>	48
Tabel 5.3.	Uji Post Hoc LSD CD-163 pada masing-masing kelompok.....	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Skema Hiperpigmentasi Akibat Iradiasi UVB	15
Gambar 2.2	Kemampuan Diferensiasi dari MSC	16
Gambar 2.3.	Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC	20
Gambar 3.1.	Kerangka teori.....	28
Gambar 3.2.	Kerangka konsep.....	29
Gambar 4.1.	Alur Rancangan.....	30
Gambar 4.2.	Mencit C57BL/6	33
Gambar 4.3.	Alur Penelitian	40
Gambar 5.1.	Hasil kultur MSCs.....	42
Gambar 5.2.	Uji diferensiasi adipogenik, pewarnaan oil red O uji diferensiasi osteogenik menggunakan pewarnaan Alizarin red.	43
Gambar 5.3.	Validasi exosome terhadap ekspresi marker CD81, CD63 dan CD9.....	44
Gambar 5.4.	Makroskopis dan morfologi kulit mencit yang dipapar UVB selama 14 hari.	45
Gambar 5.5.	Grafik ekspresi IL-10 pada tiap kelompok	47
Gambar 5.6.	Grafik ekspresi CD-163 pada tiap kelompok	49

DAFTAR SINGKATAN

AA	: <i>Asam Askorbat</i>
AP-1	: <i>Activator protein 1</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
cAMP	: <i>Cyclic adenosida monofosfat</i>
CD	: <i>Cluster Of Differentiation</i>
EPO	: <i>Erythroietin</i>
EH-MSCs	: <i>Exosome hypoxia mesenchymal stem cells</i>
GSH	: <i>Gluthatione</i>
GCSF	: <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
HLA-DR	: <i>Human leukocyte antigens- isotype DR</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
MAPK	: <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MED	: <i>Minimal erythema dose</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PIGF	: <i>Placental growth factor</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SDF- 1	: <i>Stromal-derived factor-1</i>
STAT3	: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SIRT	: <i>Sirtuin</i>
SCF	: <i>Stem cell factor</i>
SOD	: <i>Superoksida dismutase</i>
TNF α	: <i>Tumor necrosis factor α</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Izin Etik Penelitian	67
Lampiran 2. Keterangan Hasil Penelitian	68
Lampiran 3. Lampiran Kegiatan Penelitian	71
Lampiran 4. Lampiran Analisis Statistik	72



ABSTRAK

Latar Belakang: Hiperpigmentasi pada kulit merupakan akibat dari paparan UVB yang menyebabkan stres oksidatif akibat peningkatan ROS sehingga menimbulkan sejumlah masalah kulit termasuk penumpukan melanin. Exosome sebagai vesikel kecil yang dilepaskan oleh sel, dapat memengaruhi aktivitas melanosit dan peran penting dalam berbagai proses hiperpigmentasi. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin c terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163

Metode: Penelitian eksperimental *in vivo* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*, subjek menggunakan 30 ekor mencit, dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok 1 mencit sehat, kelompok 2 kontrol tanpa intervensi, kelompok 3 perlakuan injeksi glutathione dan vitamin C, kelompok 4 perlakuan exosome, kelompok 5 perlakuan injeksi exosome dan glutathione serta vitamin C. Ekspresi gen IL-10 dan ekspresi CD-163 dilakukan uji *One Way Anova*

Hasil: Hasil rata rata ekspresi gen IL-10 tertinggi pada kelompok K4 $1,94 \pm 2,06$, kelompok K3 didapatkan nilai terendah $0,44 \pm 0,23$. kelompok K2 $0,99 \pm 0,87$, dan kelompok K5 $0,88 \pm 0,37$. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar semua kelompok $p=0,135$ ($p < 0,05$). Rata rata ekspresi gen CD-163 tertinggi pada kelompok K5 $24,14 \pm 0,94$, kelompok K1 dengan nilai terendah $6,38 \pm 0,94$, kelompok K4 $20,84 \pm 0,93$, kelompok K3 $19,06 \pm 0,89$ dan kelompok K2 $7,41 \pm 1,09$. Hasil analisis uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan signifikan antar semua kelompok $p=0,000$ ($p < 0,05$)

Kesimpulan: Pemberian EH-MSC dan glutathione dengan vitamin C tidak berpengaruh terhadap ekspresi IL-10, namun mempengaruhi ekspresi CD163 lebih tinggi pada jaringan kulit model hiperpigmentasi.

Kata Kunci: Ekspresi IL-10, ekspresi CD163, hiperpigmentasi, exosome mesenchymal stem cell hypoxia (EH-MSC)

ABSTRACT

Background: Hyperpigmentation of the skin is a result of UVB exposure that causes oxidative stress due to increased ROS, causing a number of skin problems including melanin accumulation. Exosomes as small vesicles released by cells can affect melanocyte activity and play an important role in various hyperpigmentation processes. The study aims to determine the effect of exosome mesenchymal stem cell hypoxia (EH-MSc) and glutathione with vitamin C on IL-10 and CD163 gene expression.

Method: In vivo experimental study with Post Test Only Control Group Design, subjects using 30 mice, divided into 5 treatment groups, namely group 1 healthy mice, group 2 control without intervention, group 3 glutathione injection and vitamin C treatment, group 4 exosome treatment, group 5 exosome injection and glutathione and vitamin C treatment. IL-10 gene expression and CD-163 expression were tested by One Way Anova

Results: The average result of the highest IL-10 gene expression was in group K4 1.94 ± 2.06 , group K3 obtained the lowest value of 0.44 ± 0.23 . group K2 0.99 ± 0.87 , and group K5 0.88 ± 0.37 . The results of the One Way Anova test showed no significant difference between all groups $p = 0.135$ ($p < 0.05$). The average expression of the CD-163 gene was highest in the K5 group 24.14 ± 0.94 , the K1 group with the lowest value of 6.38 ± 0.94 , the K4 group 20.84 ± 0.93 , the K3 group 19.06 ± 0.89 and the K2 group 7.41 ± 1.09 . The results of the One Way Anova test analysis showed a significant difference between all groups $p = 0.000$ ($p < 0.05$)

Conclusion: Administration of EH-MSc and glutathione with vitamin C did not affect IL-10 expression, but affected higher CD163 expression in skin tissue of hyperpigmentation models.

Keywords: IL-10 expression, CD163 expression, hyperpigmentation, exosome mesenchymal stem cell hypoxia (EH-MSc)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperpigmentasi pada kulit merupakan hasil dari paparan sinar ultraviolet B (UVB) yang menyebabkan stres oksidatif akibat peningkatan *reactive oxygen species* (ROS).¹ Peningkatan ROS mengakibatkan sejumlah masalah kulit termasuk kemerahan, pengerasan, penumpukan melanin, penuaan kulit, dan bahkan risiko kanker.² Penumpukan melanin dan proses inflamasi menjadi faktor penting penyebab hiperpigmentasi.³⁻⁵ Exosome sebagai vesikel kecil yang dilepaskan oleh sel, telah menunjukkan peran penting dalam berbagai proses biologis, termasuk hiperpigmentasi.³ Exosome dapat memengaruhi aktivitas melanosit.⁶ Exosome juga dapat memengaruhi jalur sinyal yang terlibat dalam produksi IL-10 dan ekspresi CD163 dalam sel target.⁷

Paparan UVB juga terkait dengan 8% kasus kanker kulit, termasuk jenis karsinoma skuamosa yang bisa metastasis. Pada tahun 2020, kasus hiperpigmentasi meningkat dengan signifikan, mencatat lebih dari 100.350 kasus baru dan 6.850 kasus kematian akibat perkembangan menjadi kanker kulit. Pada penelitian 2022, tingkat *asam askorbat* (AA) pada epidermal dan dermal dikulit menua alami adalah 69% (usia 76,1 tahun) dan 63% (usia 21 tahun). Photoaging dan penuaan alami disarankan pemberian suplementasi eksternal untuk membantu memperlambat penuaan kulit. Efek AA dalam meningkatkan kolagen kulit terlihat jelas pada pasien dengan kadar kolagen rendah dan orang dengan kulit yang menua karena sinar matahari maupun menua secara alami.⁸

ROS yang berlebihan memicu aktivasi faktor transkripsi *nuclear factor-kappa β* (NF- κ B), yang bertanggung jawab atas respon inflamasi dalam tubuh.^{4,5} Selain itu, paparan UVB meningkatkan ekspresi sitokin inflamasi.³ CD163 adalah molekul permukaan sel yang umumnya dianggap sebagai marker untuk makrofag yang berperan dalam resolusi peradangan dan memelihara homeostasis jaringan.⁹ Peran penting dalam mengatur respon imun dan meredakan peradangan dari sitokin antiinflamasi IL-10 (*Interleukin-10*) dihasilkan oleh berbagai jenis sel, termasuk makrofag, sel T, dan sel B.¹⁰ IL-10 sebagai sitokin antiinflamasi dapat meredakan peradangan yang terkait dengan hiperpigmentasi, sedangkan CD163, sebagai marker untuk makrofag yang terlibat dalam resolusi peradangan, juga dapat memainkan peran dalam mengatur respons inflamasi yang berkaitan dengan gangguan pigmentasi kulit.^{11,12} Aplikasi menggunakan antioksidan yang berperan dalam fotoproteksi seperti vitamin C dapat menghambat enzim tirosinase, sehingga mengurangi pembentukan melanin, serta digunakan untuk menghilangkan bintik-bintik hiperpigmentasi.¹³ Sama halnya dengan penggunaan glutathione yang memiliki sifat pengatur pada melanogenesis. Glutathione sebagai agen pencerah kulit dengan menghambat enzim tirosinase, yang membantu pembentukan melanin dan mengubah produksi eumelanin menjadi pheomelanin, sehingga menghasilkan pemutihan kulit.^{14,15}

Exosome *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) berkontribusi pada proses biologis seperti penyembuhan jaringan, pengaturan respons imun, dan kontrol sinyal seluler. Exosome mengubah sifat-sifat sel target dengan mengirimkan materi genetik seperti RNA dan DNA, serta protein dan lipid tertentu. Selain itu,

exosome juga berperan sebagai perantara dalam komunikasi antar sel, menyampaikan sinyal penting yang mengatur pertumbuhan, diferensiasi, dan fungsi sel.^{1,4,5} Exosome adalah partikel kecil berukuran sekitar 30-150 nanometer yang diproduksi oleh berbagai jenis sel dan memiliki peran vital dalam komunikasi seluler.⁴ Exosome mengandung beragam materi genetik, protein, lipid, dan faktor bioaktif lainnya.⁴ Exosome yang berasal dari sel punca mesenkimal (MSCs) menjadi fokus penelitian utama karena kemampuannya yang terbukti dalam regenerasi dan modulasi sistem kekebalan tubuh. Penelitian pada 2015 menunjukkan bahwa sekitar 4.2% dari subjek yang terpapar tiga kali *minimal erythema dose* (MED) UVB mengalami hiperpigmentasi.³ Pada penelitian 2023, penyerapan nano partikel *glutathione* (GSH), meningkatkan fungsi kekebalan terhadap respon imun. Glutathione merupakan antioksidan intraseluler penting yang bertanggung jawab untuk dapat menetralkan ROS, antioksidan berfungsi sebagai kofaktor glutathione peroksidase untuk mengurangi radikal bebas dan peroksida. Pemberian GSH oral terbukti memulihkan kadar GSH mengurangi stress oksidatif, dan juga meningkatkan respons imun tubuh terhadap infeksi.¹⁶

Berdasarkan hal tersebut peneliti ingin melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia* (EH) MSCs konsentrasi 300 μ l dengan mengkombinasi glutathione dan vitamin C terhadap pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi iradiasi UVB secara *in vivo*.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka disimpulkan rumusan masalah pada penelitian ini, apa pengaruh *Exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSc) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian exosome mesenchymal stem cell hypoxia (EH-MSc) dan glutathione dengan vitamin c terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.3.2. Khusus

1. Membuktikan pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSc) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen IL-10 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.
2. Membuktikan pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSc) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen CD163 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

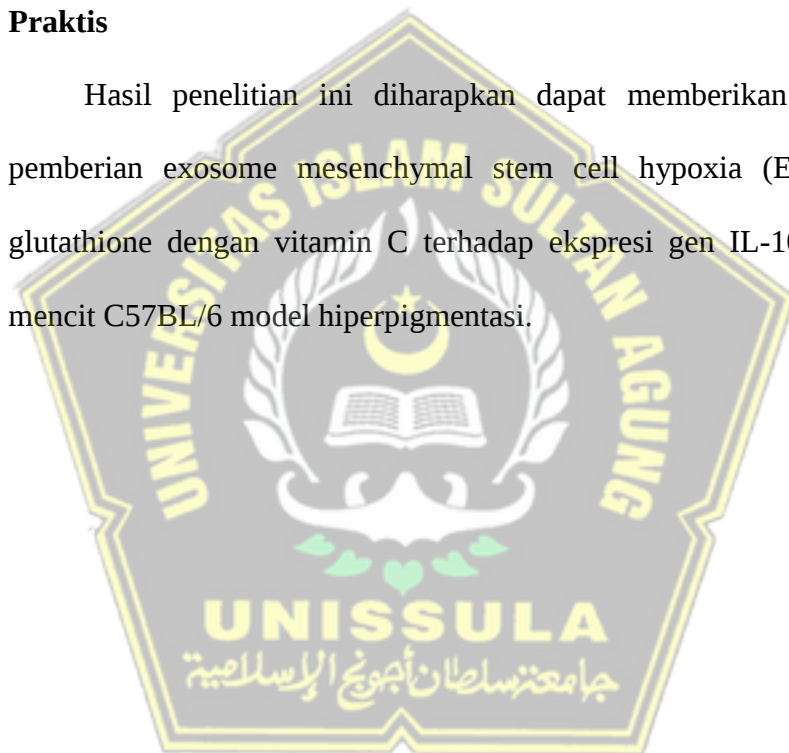
1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-
MSC) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.4.2. Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-
MSC) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163 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 KY, Xin HB, 2021. ²	Human amniotic stem cells-derived exosomal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively	In Vivo Eksperimental	miR-181a-5p dan miR-199a yang berasal dari exosome hASCs menghambat melanogenesis dengan menekan MITF
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- κ B siRNA-encapsulating exosomes as a modality for therapy of skin lesions.	In Vivo 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- β R1/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 Mira Indramaya, Dwi Murtiastutik, Hari Sukanto, Fedik A Rantam, 2019	The effects of amniotic membrane stem cell-conditioned medium on hyperpigmentasi	Clinical study, Eksperimental	amniotic membrane stem cell-conditioned medium memperbaiki kondisi hiperpigmentasi pada 24 subjek wanita

Penelitian terdahulu menggunakan *Human amniotic stem cells* (hASC) memiliki antihiperpigmentasi yang kuat pada kulit secara in vivo dan in vitro. human amniotic epithelial stem cells (hAESC) dan human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSC) diidentifikasi melalui RT-PCR, analisis sitometri aliran, dan imunofluoresensi. Efek hASC dan hASC-CM pada pigmentasi dievaluasi dalam sel B16F10 yang distimulasi dengan hormon perangsang α -melanosit (α -MSH), dan telinga tikus atau pengganti kulit manusia yang diobati dengan radiasi ultraviolet B (UVB). Ekspresi protein utama yang terkait dengan melanogenesis dan fluks autofagik dideteksi melalui western blot dalam sel B16F10 untuk mengeksplorasi lebih lanjut efek dan mekanisme dasar hAESC-CM dan hAMSC-CM pada melanogenesis dan degradasi melanosom. miRNA yang berasal dari exosome hAMSC ditentukan melalui pengurutan. RT-PCR, western blot, analisis kandungan melanin dan uji aktivitas luciferase digunakan untuk menentukan hipopigmentasi miR-181a-5p dan miR-199a.² Penelitian mengenai efek depigmentasi BJ-5ta-Ex yaitu exosome BJ-5ta (BJ-5ta-Ex) yang berasal dari fibroblas kulit manusia mengatur melanogenesis dan melakukan eksperimen menggunakan model kulit manusia yang direkonstitusi tiga dimensi dan model tikus yang diradiasi ultraviolet B (UVB).

Penelitian eksperimen dengan mengembangkan strategi biologi sintetis yang mengintegrasikan exosome dengan sirkuit genetik buatan untuk memprogram ulang sel induk mesenkimal adiposa untuk mengekspresikan dan merakit siRNA menjadi exosome dan memfasilitasi pengiriman siRNA in vivo untuk terapi model tikus lesi kulit. Tikus dengan lesi kulit diolesi dengan siRNA *enriched exosomes*

(si-ADMSC-EXOs).⁵ Penelitian lainnya dilakukan pada 48 wanita yang dibagi secara acak menjadi dua kelompok; 24 wanita menerima *Amniotic membrane stem cell-conditioned medium* (AMSC-CM) dan 24 wanita lainnya menerima salin normal (NS). Perlakuan pengobatan diberikan sebanyak 3 kali dengan interval 2 minggu. Microneedling digunakan untuk meningkatkan penetrasi epidermis. Kemudian mengevaluasi perkembangan photoaging pada minggu ke-0, ke-4 dan ke-8, serta efek sampingnya.³

Penelitian terdahulu dengan ADSC-Exo diisolasi dan diidentifikasi. Efek ADSC-Exo dianalisis untuk melihat kemampuan proliferasi dan migrasi fibroblas turunan LS (LSF) dinilai masing-masing dengan uji CCK-8 dan scratch. qRT-PCR, western blot, dan imunofluoresensi dilakukan untuk mendeteksi LSF yang distimulasi dengan ADSC-Exo, ADSC-Exo Anti-let-7a-5p, virus let-7a-5p mimic/TGF- β R1 shRNA, dan kontrol negatif. Dampak ADSC-Exo pada tikus LS C57BL/6j dievaluasi dengan morfologi fotografis, hematoxylin-eosin (H&E), Masson trikrom, dan pewarnaan imunohistokimia. Berbeda dengan beberapa penelitian terdahulu, penelitian ini menggunakan *Exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSc) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diberikan intervensi selama 7 hari.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Interleukin-10* (IL10)

Interleukin-10 (IL-10) adalah sitokin anti-inflamasi yang memainkan peran penting dalam regulasi respon imun dan inflamasi, pada kondisi hiperpigmentasi, IL-10 berperan dalam mengatur aktivitas sel-sel kulit dan respon terhadap peradangan yang diinduksi oleh faktor-faktor eksternal seperti paparan sinar ultraviolet (UV), khususnya UVB. Paparan UVB dapat menyebabkan kerusakan sel kulit dan memicu respon inflamasi lokal. Sel-sel keratinosit yang terpapar UVB melepaskan berbagai sitokin pro-inflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$ dan $\text{IL-1}\beta$, yang memicu migrasi dan aktivasi sel-sel imun seperti makrofag dan sel dendritik ke area kulit yang terpapar.¹⁷⁻¹⁹

IL-10 diproduksi oleh berbagai jenis sel imun termasuk makrofag, sel dendritik, dan limfosit T regulator. Ketika dilepaskan, IL-10 bertindak sebagai pengatur negatif respon inflamasi dengan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi dan mengurangi aktivitas sel efektor imun yang berlebihan. IL-10 mencapai efek ini terutama melalui penghambatan jalur sinyal $\text{NF-}\kappa\text{B}$, yang merupakan jalur utama yang menginduksi ekspresi gen-gen pro-inflamasi. Selain itu, IL-10 juga mengaktifkan jalur *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) yang mendorong ekspresi gen-gen anti-inflamasi dan sitokin penekan peradangan lainnya.²⁰⁻²²

IL-10 mengurangi peradangan yang sering menjadi pemicu atau memperburuk hiperpigmentasi. Peradangan yang tidak terkontrol dapat

merangsang melanogenesis, proses di mana melanosit menghasilkan melanin, pigmen yang memberi warna pada kulit. Sitokin pro-inflamasi dapat meningkatkan aktivitas enzim tirosinase dalam melanosit, sehingga meningkatkan produksi melanin dan menyebabkan hiperpigmentasi.²¹⁻²³

Respon inflamasi ditekan melalui jalur *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) dan meningkatkan aktivitas jalur STAT3, IL-10 membantu mengurangi aktivitas tirosinase dan produksi melanin. Ini berarti bahwa IL-10 tidak hanya mengurangi kerusakan kulit akibat inflamasi tetapi juga secara langsung berkontribusi dalam mengendalikan proses pigmentasi yang berlebihan. Oleh karena itu, IL-10 memiliki peran dual dalam mengelola hiperpigmentasi yaitu mengurangi peradangan yang memicu produksi melanin dan mengatur aktivitas melanosit untuk mencegah produksi melanin yang berlebihan.^{24,25}

Pendekatan terapeutik yang meningkatkan ekspresi atau aktivitas IL-10, seperti penggunaan antioksidan kuat seperti glutathione dan vitamin C, dapat sangat efektif dalam mengatasi hiperpigmentasi. Kedua zat ini dapat menekan jalur NF- κ B dan mendukung jalur anti-inflamasi yang melibatkan IL-10, sehingga membantu mengurangi peradangan dan pigmentasi yang tidak diinginkan pada kulit. Dengan demikian, IL-10 dan jalurnya memainkan peran krusial dalam menjaga keseimbangan inflamasi dan pigmentasi kulit.²⁶⁻²⁸

2.2. CD163

CD163 adalah reseptor scavenger yang diekspresikan terutama oleh makrofag, dan memainkan peran penting dalam resolusi peradangan dan proses pembersihan heme. CD163 memiliki kemampuan untuk mengikat dan

internalisasi haptoglobin-hemoglobin kompleks, yang kemudian dimetabolisme di dalam sel makrofag. Fungsi utama dari CD163 adalah untuk membersihkan agen hemolitik yang bersifat pro-inflamasi dan pro-oksidan, sehingga membantu mengurangi stres oksidatif dan peradangan.²⁷⁻²⁹

CD163 berperan dalam mengatur respons inflamasi yang berhubungan dengan paparan sinar ultraviolet (UV), khususnya UVB. Paparan UVB dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel kulit dan memicu respon inflamasi. Sel keratinosit yang rusak akibat UVB melepaskan berbagai sitokin pro-inflamasi seperti *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dan *Interleukin 1 beta* (IL-1 β), yang mengaktifkan makrofag dan sel imun lainnya. Aktivasi makrofag ini bisa mengarah pada polaritas makrofag M1 yang pro-inflamasi, tetapi ekspresi CD163 terkait dengan makrofag M2 yang anti-inflamasi dan reparatif.^{28,29}

Makrofag M2 yang mengekspresikan CD163 berperan dalam resolusi peradangan dengan melepaskan sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan *Transforming growth factor beta* (TGF- β). CD163 sendiri diinduksi oleh sitokin anti-inflamasi IL-10 dan glukokortikoid. Dengan mengikat kompleks haptoglobin-hemoglobin, CD163 mengurangi jumlah heme bebas, yang pada gilirannya mengurangi produksi radikal bebas dan stres oksidatif di lingkungan kulit. Hal ini penting karena stres oksidatif dapat memicu produksi melanin oleh melanosit, sel yang menghasilkan pigmen kulit, sebagai mekanisme pertahanan.^{29,30}

Jalur sinyal yang melibatkan CD163 termasuk jalur Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), yang merupakan faktor transkripsi utama yang mengatur ekspresi gen-gen antioksidan. Aktivasi jalur Nrf2 oleh CD163

membantu meningkatkan kapasitas antioksidan sel, mengurangi stres oksidatif, dan mempromosikan penyembuhan jaringan. Selain itu, CD163 dapat mengurangi respon inflamasi dengan menghambat aktivasi jalur NF- κ B, yang mengurangi ekspresi sitokin pro-inflamasi dan molekul adhesi yang merekrut lebih banyak sel imun ke lokasi peradangan.^{29,30}

Peradangan kronis dan stres oksidatif adalah faktor utama yang merangsang produksi melanin berlebihan. Dengan menginduksi makrofag M2 dan ekspresi CD163, proses peradangan bisa diredam dan stres oksidatif berkurang, yang pada akhirnya menurunkan stimulasi melanosit untuk memproduksi melanin. Pendekatan terapeutik yang meningkatkan ekspresi CD163, seperti penggunaan vitamin C dan glutathione, dapat membantu mengurangi hiperpigmentasi dengan menurunkan peradangan dan stres oksidatif di kulit.^{31,32}

Vitamin C dan glutathione bekerja sinergis dengan meningkatkan jalur Nrf2 dan mengurangi jalur NF- κ B, yang mendukung ekspresi CD163 dan fungsi anti-inflamasi serta antioksidannya. Dengan demikian, CD163 memainkan peran penting dalam mengatasi hiperpigmentasi melalui modulasi respon inflamasi dan kapasitas antioksidan, membantu menyeimbangkan produksi melanin dan menjaga kesehatan kulit.³¹⁻³³

2.3. Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi adalah kondisi terjadinya bercak pada kulit yang menyebabkan kulit terlihat menjadi lebih gelap karena terjadinya peningkatan melanin. Beberapa faktor terjadinya hiperpigmentasi karena faktor usia, intrinsik dan ekstrinsik. Faktor utama adalah faktor usia dengan bertambahnya usia

produksi dari melanin dan melanosit menjadi tidak merata sehingga fungsi regeneratif kulit menjadi menurun, dan dapat menyebabkan penumpukan melanin pada daerah tertentu pada kulit. Hiperpigmentasi akibat penambahan usia terlihat sebagai bintik penuaan (*age spot*) atau disebut sebagai *lentigines* yang lebih terlihat pada area kulit yang sering terpapar oleh sinar matahari.³⁴

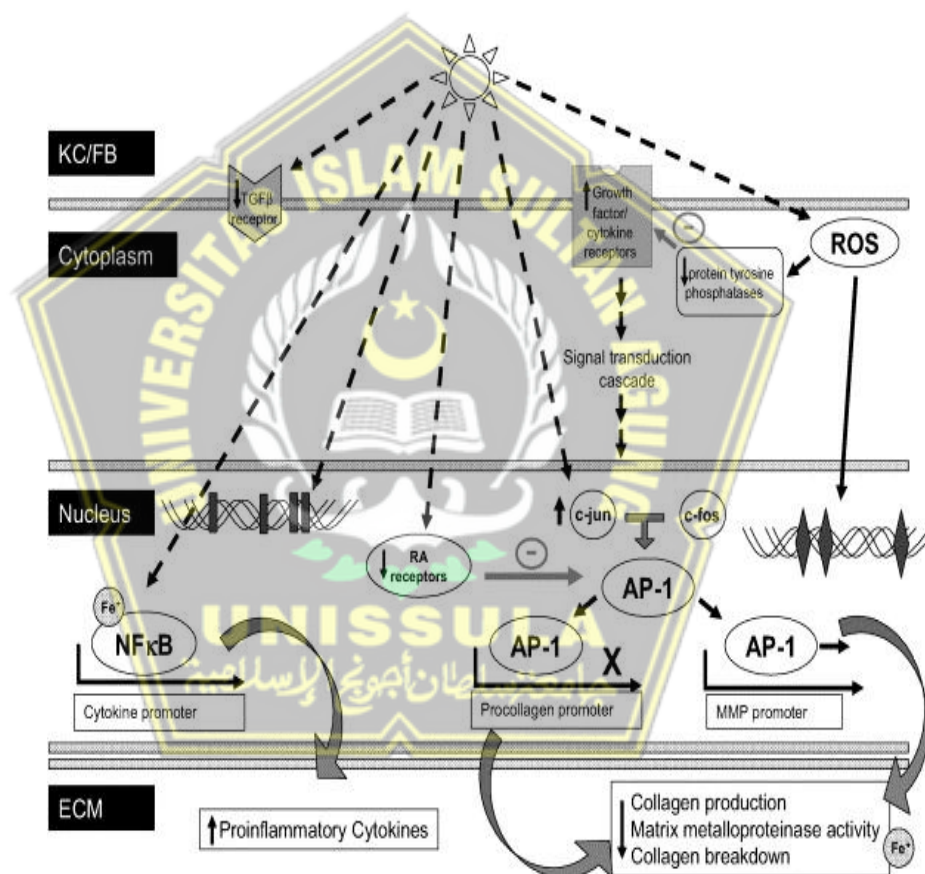
Faktor intrinsik seperti genetika, hormon, dan kesehatan umum berpengaruh terhadap hiperpigmentasi seseorang, kulit yang semakin gelap memiliki resiko semakin tinggi terjadinya hiperpigmentasi. Perubahan hormonal seperti kehamilan, menopause atau pada penggunaan kontrasepsi dapat memacu terjadinya hiperpigmentasi. Faktor ekstrinsik meliputi paparan sinar matahari, polusi, dan penggunaan kosmetik tertentu serta trauma pada kulit. Asap kendaraan, polusi lingkungan memicu stress oksidatif pada kulit, dapat memperburuk hiperpigmentasi. Beberapa kosmetik dan perawatan kulit bisa menyebabkan iritasi maupun alergi dimana dapat memperburuk hiperpigmentasi.³⁵

Faktor ekstrinsik seperti penuaan dini yang ditandai hiperpigmentasi pada kulit yang disebabkan oleh paparan berulang oleh radiasi UVB, terutama dari matahari tetapi juga dapat disebabkan oleh sumber UVB buatan. Hiperpigmentasi berbeda dari penuaan intrinsik dimana efek merusak dari sinar UVB mengubah struktur kulit normal secara cepat dan signifikan.^{36,37} Ditandai dengan cepatnya proliferasi keratinosit, dan serat kolagen mengalami degradasi, menjadikan kerutan dan banyak melanosit pigmentasi.³⁵

Hiperpigmentasi akan terjadi apabila kulit terpapar sinar UVB secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu. Pejalan kronis sinar UVB dan UVB sangat berperan dalam terjadinya hiperpigmentasi dan photocarcinogenesis. Kerusakan kulit pada hiperpigmentasi dapat terjadi pada komponen epidermis, dermis maupun jaringan appendages kulit. Salah satu perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit yang mengalami hiperpigmentasi dapat berupa meningkatnya jumlah melanin dan berkurangnya jumlah kolagen secara bermakna. Kolagen merupakan bagian terbesar dari lapisan dermis, berkontribusi sekitar 70% dari massa kering kulit, sehingga kerusakannya merupakan penyebab utama manifestasi penuaan kulit berupa kerutan (wrinkle), hilangnya elastisitas, kekenduran (sagging) dan pigmentasi. Pigmentasi kulit disebabkan karena meningkatnya kadar melanin yang signifikan akibat paparan dari luar.³⁷⁻³⁹

Dua regulator utama pada proses pembentukan kolagen oleh sel fibroblas adalah *Transforming growth factor β* (TGF- β) dan AP-1. TGF- β merupakan sitokin yang merangsang produksi kolagen, sedangkan AP-1 merupakan faktor transkripsi yang menghambat produksi kolagen serta merangsang pemecahan kolagen. Kulit adalah lapisan terluar pelindung dari tubuh manusia dan karena itu segala kerusakan yang terjadi pasti akan cukup terlihat. Kerusakan dan penuaan kulit dapat disebabkan oleh faktor intrinsik dan juga faktor ekstrinsik. Penuaan ekstrinsik yang terutama disebabkan oleh radiasi sinar UVB (hiperpigmentasi) akan menyebabkan peningkatan produksi ROS pada lapisan dermis.³⁸ ROS tersebut akan memicu serangkaian reaksi molekuler berantai sehingga meningkatkan pembentukan AP-1 yang akan menstimulasi proses transkripsi

enzim *Matrix metalloproteinase* (MMP) yang berperan dalam proses degradasi kolagen. ROS bersama dengan AP-1 juga memiliki peranan dalam menghambat sintesis kolagen dengan cara menghambat reseptor tipe 2 dari TGF- β . Serangkaian proses tersebut pada intinya akan menyebabkan peningkatan pemecahan kolagen serta penurunan produksi kolagen yang merupakan dasar patofisiologi dari penuaan kulit.³⁹

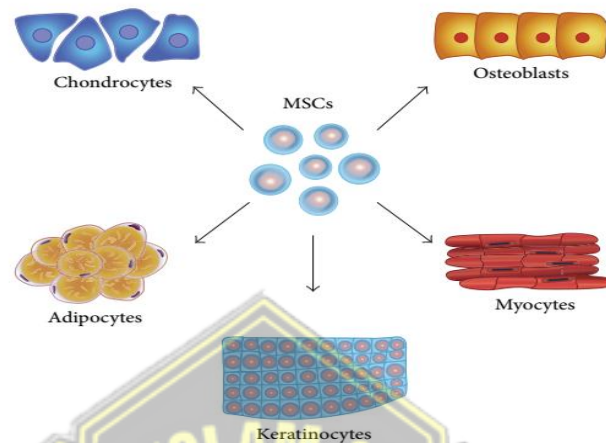


Gambar 2.1. Skema Hiperpigmentasi Akibat Iradiasi UVB

2.4. MSCs

Mesenchymal stem cells memiliki sifat memperbarui diri dan dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel seperti osteoblas, adiposit, kondrosit,

tenosit, dan miosit. MSC ditemukan dalam berbagai jaringan termasuk sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat. Mereka ditandai dengan penanda



Gambar 2.2 Kemampuan Diferensiasi dari MSC

permukaan CD seperti CD44+, CD73+, CD90+, dan CD105+ serta dibedakan dari sel hematopoietik yang tidak memiliki CD34, CD45, CD14, dan *Human leucocyte Antigen- Isotipe DR* (HLA-DR). MSC juga memiliki kemampuan imunomodulator, reparatif, dan regeneratif melalui pensinyalan parakrin, yang membuatnya sangat potensial untuk aplikasi terapeutik.^{40,41}

2.4.1. Fungsi

Mesenchymal stem cells memiliki fungsi dalam proses regenerasi jaringan karena kemampuan mereka untuk proliferasi, diferensiasi, dan menghasilkan berbagai produk seperti faktor pertumbuhan dan sitokin. Stem cell dapat berkomunikasi melalui mekanisme parakrin dan autokrin dengan menggunakan sitokin yang dihasilkan. Dalam komunikasi parakrin, mereka merangsang aktivasi sel lain dalam proses penyembuhan. Stem cell juga memiliki kemampuan homing, yaitu kemampuan untuk menuju organ target sebagai tahap awal dalam proses penyembuhan

sebelum menempel, berkembang biak, dan berdiferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan. Kemampuan MSC untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel menjadikannya menarik untuk aplikasi klinis. Berbagai penelitian telah melaporkan keterlibatan MSC dalam pemulihan dan regenerasi berbagai kerusakan jaringan, termasuk:^{3,41,42}

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

2.4.2. Mobilisasi MSC

MSC ketika ditransplantasikan secara sistemik, memiliki kemampuan untuk bermigrasi ke lokasi kerusakan jaringan pada hewan uji, mengindikasikan kapasitas migrasi MSC. Namun, mekanisme migrasi MSC masih belum sepenuhnya diketahui. Reseptor kemokin dan ligannya, serta molekul adhesi, memainkan peran krusial dalam proses homing pada jaringan tertentu melalui leukosit. Berbagai penelitian telah melaporkan ekspresi fungsional dari reseptor kemokin dan molekul adhesi pada MSC manusia.^{3,42,43}

Memanfaatkan potensi migrasi MSC melalui modulasi interaksi reseptor kemokin adalah metode yang kuat untuk meningkatkan

kemampuan MSC dalam memperbaiki kelainan bawaan jaringan mesenchymal atau memperbaiki jaringan secara in vivo. Mediator sinyal yang dilepaskan oleh jaringan yang rusak berfungsi untuk memobilisasi MSC menuju lokasi kerusakan. Beberapa mediator sinyal tersebut meliputi *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *granulocyte colony stimulating factor* (GCSF), *kemokin*, *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), dan *interleukin* (IL-8, IL-6, IL-3, IL-2, dan IL-1 β).⁴⁴⁻⁴⁶

2.4.3. Konsep Small Molecule Growth Factor MSC

Terminologi fungsional MSC didasarkan pada kemampuannya untuk mengeluarkan berbagai molekul larut secara parakrin. Konsep parakrin mengacu pada komunikasi MSC dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepaskan oleh MSC. Konsep faktor pertumbuhan molekul kecil MSC mencakup beberapa aspek:⁴⁷

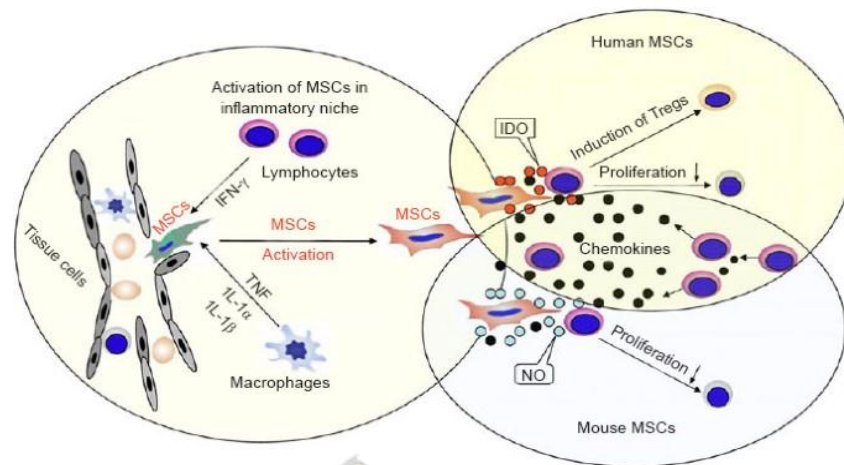
1. Kompleksitas teknik isolasi MSC: Teknik dan metode isolasi MSC memerlukan prosedur yang kompleks, termasuk kerja aseptis dan waktu kultur yang lama (beberapa minggu) untuk mendapatkan MSC yang homogen dengan potensi stemness tinggi, terutama kemampuan multi-diferensiasi menjadi berbagai jenis sel jaringan spesifik. Banyak faktor yang harus dikontrol 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 regenerasi MSC mungkin tidak optimal. Faktor-faktor internal dalam jaringan cedera juga mempengaruhi waktu paruh kehidupan MSC.
3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi: Penelitian terbaru menunjukkan bahwa sebagian besar MSC yang diberikan secara intravena akan 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 exosome yang dilepaskan oleh MSC secara parakrin merupakan faktor utama dalam regenerasi jaringan.

2.4.4. Induksi Small Molecule dan Exosome MSC

Karena peran penting molekul kecil dan exosome MSC, berbagai upaya telah dilakukan untuk memproduksi molekul kecil dan exosome ini secara in vitro. Induksi molekul kecil faktor pertumbuhan MSC dapat dibagi menjadi dua metode:⁴⁶

1. Induksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi: MSC yang diaktifkan oleh TNF- α secara teoritis dapat melepaskan berbagai molekul anti-inflamasi.



Gambar 2.3. Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC

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, *katalase* (CAT), dan *sirtuin* (SIRT)1 dan 3 yang terakumulasi dalam exosome. 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 exosome, seperti GPX, dapat mengaktivasi faktor transkripsi NRF2 yang meningkatkan ekspresi antioksidan. Selain itu, berbagai miRNA dalam exosome

MSC hipoksia, seperti miR-21, miR-22-3p, dan miR-215-5p, juga berperan dalam menghambat stres oksidatif.

2.5. Glutathione dan Vitamin C

Kombinasi injeksi glutathione dan vitamin C memiliki potensi yang signifikan dalam mengatasi hiperpigmentasi kulit melalui mekanisme yang saling melengkapi. Glutathione adalah antioksidan yang sangat penting dalam melawan stres oksidatif di dalam sel. Ketika disuntikkan, glutathione dapat mengurangi produksi melanin dengan cara menghambat enzim tirosinase, yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis melanin. Selain itu, glutathione memiliki kemampuan untuk meningkatkan ekspresi IL-10, sebuah sitokin anti-inflamasi, dengan menekan jalur sinyal NF- κ B dan p38 *Mitogen activated protein kinase* (MAPK) yang biasanya meningkatkan peradangan.⁴⁷⁻⁴⁹

Vitamin C, atau asam askorbat, adalah antioksidan kuat lainnya yang tidak hanya berperan dalam sintesis kolagen, tetapi juga mengurangi produksi melanin dengan menurunkan aktivitas tirosinase. Ketika digunakan bersamaan dengan glutathione, vitamin C meningkatkan efektivitasnya dengan cara memperkuat sifat antioksidan glutathione dan menambah kemampuannya untuk mengurangi stres oksidatif. Vitamin C juga berperan dalam menekan jalur sinyal NF- κ B dan AP-1, serta meningkatkan *Adenosina monofosfat siklik* (cAMP), yang semuanya berkontribusi pada pengurangan peradangan dan peningkatan ekspresi IL-10.⁴⁸⁻⁵⁰

Vitamin C meningkatkan jalur *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), yang meningkatkan ekspresi CD163 pada makrofag, reseptor yang terkait dengan resolusi peradangan dan proses penyembuhan kulit. Dengan mengurangi

peradangan dan stres oksidatif, serta langsung menurunkan produksi melanin, kombinasi injeksi glutathione dan vitamin C secara sinergis mengurangi hiperpigmentasi. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami sepenuhnya mekanisme ini, tetapi bukti yang ada menunjukkan bahwa kombinasi ini efektif dalam memodulasi ekspresi gen dan jalur yang terlibat dalam hiperpigmentasi, sehingga menawarkan solusi potensial untuk terapi dermatologis yang lebih efisien.⁵⁰⁻⁵³

2.6. Pengaruh Exosome dan Glutathione dengan Vitamin C terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163

Exosome, glutathione, dan vitamin C memiliki peran penting dalam modulasi ekspresi gen dan pengaruhnya terhadap proses inflamasi serta pigmentasi kulit, termasuk hiperpigmentasi. Exosome adalah vesikel kecil yang dikeluarkan oleh berbagai jenis sel dan berfungsi dalam komunikasi antar sel dengan membawa molekul bioaktif seperti RNA, protein, dan lipid yang dapat mempengaruhi ekspresi gen pada sel target. Dalam konteks ekspresi gen IL-10 dan CD163, exosome dapat mengangkut microRNA dan protein yang meningkatkan atau menurunkan ekspresi IL-10, sebuah sitokin anti-inflamasi yang membantu mengurangi peradangan dan menenangkan respons imun yang berlebihan.^{51,53,54} Hal ini sangat bermanfaat dalam mengatasi hiperpigmentasi yang disebabkan oleh inflamasi. Exosome juga dapat memodulasi ekspresi CD163, reseptor scavenger yang diekspresikan oleh makrofag dan terkait dengan resolusi peradangan, dengan meningkatkan kemampuannya dalam membersihkan

hemoglobin dan produk degradasinya, sehingga membantu meredakan proses inflamasi pada kulit.⁵⁴⁻⁵⁶

Glutathione adalah antioksidan penting yang berperan dalam melawan stres oksidatif di dalam sel. Peningkatan kadar glutathione dapat meningkatkan ekspresi IL-10 dengan mengurangi stres oksidatif dan menekan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 β . Dengan demikian, glutathione dapat membantu mengurangi peradangan yang berkontribusi pada hiperpigmentasi. Selain itu, glutathione dapat meningkatkan ekspresi CD163, karena mengurangi stres oksidatif dalam makrofag dan meningkatkan kemampuan mereka untuk membersihkan sisa-sisa sel yang rusak dan molekul pro-inflamasi.^{56,57}

Vitamin C, atau asam askorbat, adalah antioksidan kuat yang berperan dalam sintesis kolagen dan melanin. Vitamin C dapat menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi dan meningkatkan produksi IL-10, sehingga membantu mengurangi inflamasi dan mencegah hiperpigmentasi akibat peradangan kronis. Vitamin C juga dapat meningkatkan ekspresi CD163 melalui pengurangan stres oksidatif dan modifikasi respons inflamasi makrofag.^{57,58}

Kombinasi exosome, glutathione, dan vitamin C dapat memberikan efek sinergis pada pengaturan ekspresi gen IL-10 dan CD163. Exosome dapat berfungsi sebagai pembawa yang efektif untuk molekul-molekul ini, meningkatkan stabilitas dan bioavailabilitas mereka.^{59,60} Sementara itu, glutathione dan vitamin C sebagai antioksidan kuat dapat memperkuat aktivitas anti-inflamasi dan antioksidan, yang berkontribusi pada pengurangan hiperpigmentasi dengan mengatur kembali ekspresi gen yang terlibat dalam proses

inflamasi dan perbaikan jaringan. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami mekanisme spesifik dari interaksi ini dalam konteks hiperpigmentasi kulit, tetapi potensi manfaat kombinasi ini dalam modulasi ekspresi gen IL-10 dan CD163 sangat menjanjikan untuk terapi dermatologis.⁶¹⁻⁶³



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Exosome, glutathione, dan vitamin C berperan penting dalam modulasi ekspresi gen dan pengaruhnya terhadap inflamasi serta pigmentasi kulit, termasuk hiperpigmentasi, melalui beberapa jalur molekuler yang terlibat.³⁷ Exosome adalah vesikel kecil yang berfungsi dalam komunikasi antar sel dengan membawa molekul bioaktif seperti RNA, protein, dan lipid. Dalam konteks ekspresi gen IL-10 dan CD163, exosome dapat mengangkut microRNA dan protein yang mempengaruhi jalur NF- κ B dan STAT3.³⁹⁻⁴¹ Exosome yang membawa microRNA tertentu dapat menekan jalur NF- κ B, yang umumnya terlibat dalam produksi sitokin pro-inflamasi, dan sekaligus mengaktifkan jalur STAT3 yang meningkatkan ekspresi IL-10, sitokin anti-inflamasi yang membantu mengurangi peradangan. Exosome juga dapat memodulasi ekspresi CD163, reseptor scavenger pada makrofag yang terlibat dalam resolusi peradangan, melalui jalur sinyal yang menginduksi polaritas makrofag ke fenotip M2 yang anti-inflamasi.³⁹⁻⁴²

Glutathione adalah antioksidan utama dalam sel yang berperan dalam melawan stres oksidatif dan mengatur redoks homeostasis. Glutathione mempengaruhi ekspresi IL-10 melalui penghambatan jalur MAPK (p38 MAPK) dan mengurangi aktivasi NF- κ B, yang mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 β , sekaligus meningkatkan ekspresi IL-10.⁵⁵⁻⁵⁹ Dengan demikian, glutathione membantu meredakan inflamasi yang berkontribusi pada

hiperpigmentasi. Selain itu, glutathione dapat meningkatkan ekspresi CD163 melalui pengurangan stres oksidatif dalam makrofag, yang meningkatkan kemampuan mereka untuk membersihkan sisa-sisa sel yang rusak dan molekul pro-inflamasi, serta melalui peningkatan jalur Nrf2 yang juga terkait dengan mekanisme antioksidan.⁵⁷⁻⁶⁰

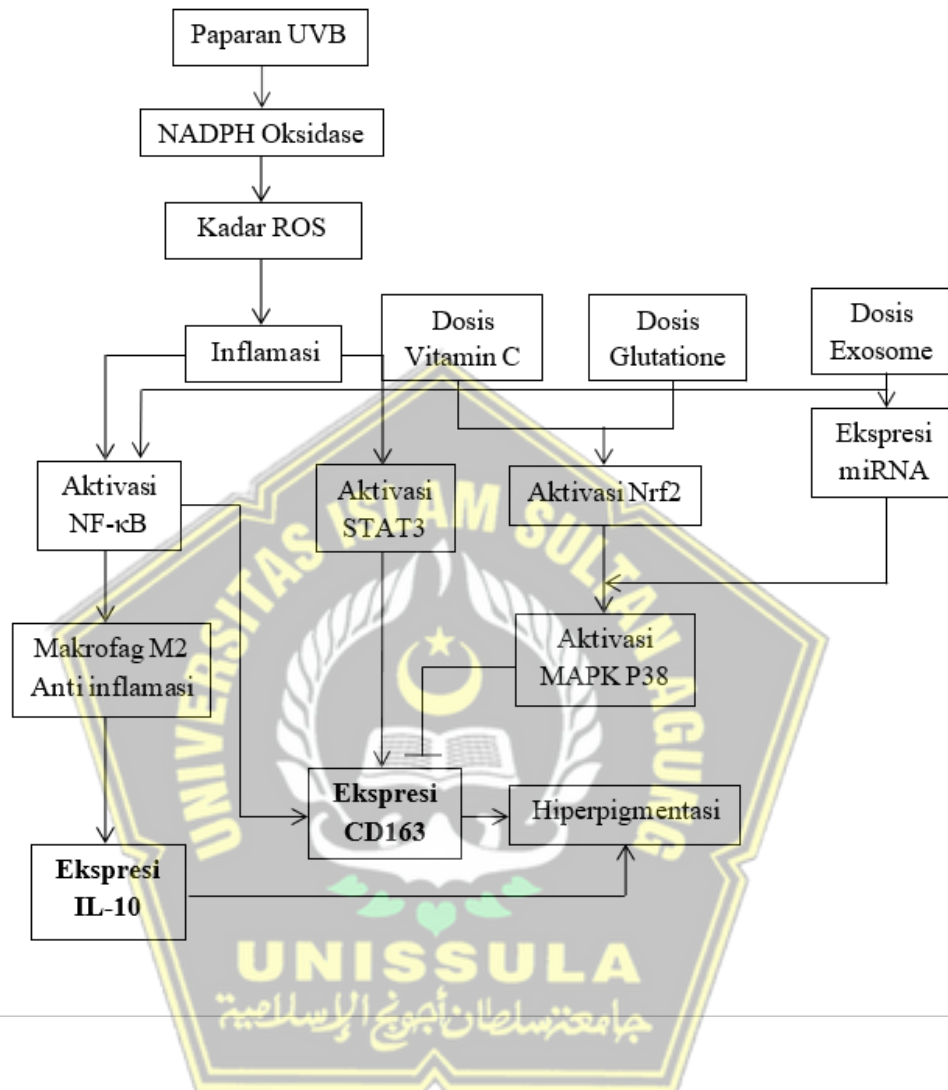
Vitamin C, atau asam askorbat, adalah antioksidan kuat yang juga berperan dalam sintesis kolagen dan melanin. Vitamin C dapat memodulasi sistem imun dengan cara menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi melalui penghambatan jalur NF- κ B dan AP-1, serta meningkatkan produksi IL-10 melalui jalur STAT3 dan cAMP.^{64,65} Dengan meningkatkan IL-10, vitamin C membantu mengurangi inflamasi dan mencegah hiperpigmentasi akibat peradangan kronis. Vitamin C juga meningkatkan ekspresi CD163 melalui pengurangan stres oksidatif dan peningkatan aktivitas jalur Nrf2 dalam makrofag, yang memperkuat kapasitas antioksidan dan anti-inflamasi mereka.⁶⁶⁻⁶⁸

Kombinasi exosome, glutathione, dan vitamin C memberikan efek sinergis pada pengaturan ekspresi gen IL-10 dan CD163. Exosome dapat berfungsi sebagai pembawa yang efektif untuk molekul-molekul ini, meningkatkan stabilitas dan bioavailabilitas mereka. Sementara itu, glutathione dan vitamin C sebagai antioksidan kuat memperkuat aktivitas anti-inflamasi dan antioksidan, berkontribusi pada pengurangan hiperpigmentasi dengan mengatur kembali ekspresi gen yang terlibat dalam proses inflamasi dan perbaikan jaringan melalui jalur sinyal NF- κ B, STAT3, Nrf2, dan MAPK. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami mekanisme spesifik dari interaksi ini dalam konteks

hiperpigmentasi kulit, tetapi potensi manfaat kombinasi ini dalam modulasi ekspresi gen IL-10 dan CD163 sangat menjanjikan untuk terapi dermatologis.^{27,69–}

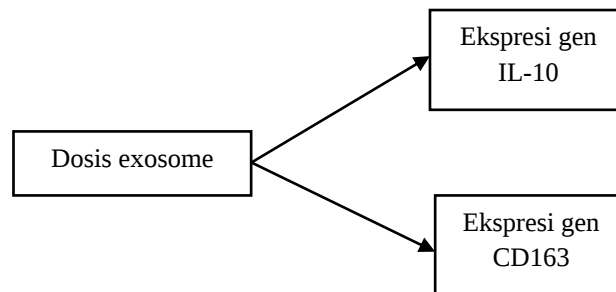
72





Gambar 3.1. Kerangka teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh exosome *mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin c terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

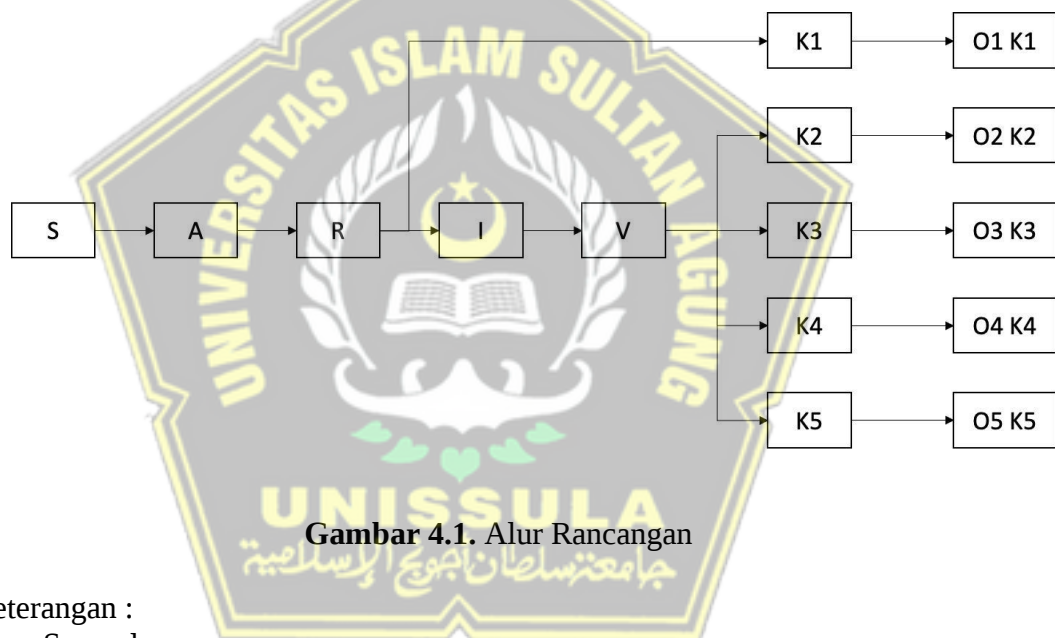
BAB IV

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

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 100ul dan vitamin C 100ul)

K4 : Perlakuan 2 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksiexosome 300ul).

K5 : Perlakuan 3 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 100ul + vitamin C 100ul dan perlakuan injeksi exosome 300ul)

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 IL-10 dan CD168.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. EH-MSK

Exosome adalah vesikel kecil yang mengandung materi genetik dan protein, yang dilepaskan oleh sel dan berfungsi sebagai perantara komunikasi antar sel. Injeksi exosome terbagi dalam beberapa kelompok yaitu Perlakuan 2 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan exosome 300ul (konversi dosis tikus ke mencit menjadi 42ul)) dan Perlakuan 3 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 100ul (6,24ul) + vitamin C 100ul (1,26ul) dan perlakuan exosome 300ul (42ul).

Skala : Rasio

4.2.2.2. Ekspresi IL-10

Ekspresi IL-10 adalah ekspresi IL-10 yang diproduksi oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Kadar IL-10 dianalisis menggunakan qRT-PCR.

Unit: %

Skala: rasio

4.2.2.3. Ekspresi CD163

Ekspresi CD163 adalah jumlah ekspresi CD163 pada fraksi area melanin yang diekspresikan oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Ekspresi CD163 dianalisis menggunakan metode spesifik staining imunohistokimia.

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 100ul dan vitamin C 100ul) dan perlakuan 3 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 100ul + vitamin C 100ul dan perlakuan exosome 300ul).

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 20-25gr yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh Animal Model Research Center SCCR Indonesia.

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah mencit C57BL/6 yang diberi paparan UVB 180mJ/cm².



Gambar 4.2. Mencit C57BL/6

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. Mencit sehat dan aktif selama masa aklimatisasi
5. Berat badan 20-25 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Mencit jantan galur C57BL/6 dengan kriteria:

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

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang masuk kriteria drop out pada penelitian 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 4 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 100ul dan vitamin C 100ul, kelompok 4 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan exosome 300ul, kelompok 5 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 100ul + vitamin C 100ul dan perlakuan exosome 300ul.

4.3.4. Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung berdasarkan sampel eksperimental dari Federer. Rumus Federer yaitu: $(t-1)(n-1) \geq 15$, 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 mencit 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 pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat

yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm biopsy punch, 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 clearance* 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% CO_2 .
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 O_2 dalam hypoxia chamber menunjukkan konsentrasi 5%.
3. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .
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 secretome

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

4.5.3. Penetapan Dosis

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu ditentukan dosis yang akan digunakan untuk penelitian. Penelitian sebelumnya menggunakan exosome sebanyak 300ul untuk injeksi subcutan pada tikus Wistar secara subkutan.

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 mencit
4. Cukur bagian punggung mencit selebar 2x2cm, tunggu mencit sampai terbebas dari efek sersedasi
5. Mencit dipapar UVB 180mJ/cm² di alam 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-14 untuk dilakukan pewarnaan Masson Fontana

8. Pengamatan dilakukan oleh spesialis patologi anatomi, hasil analisis terdapat peningkatan jumlah melanin di tandai dengan munculnya warna kehitaman pada bagian epidermis.⁷³

4.5.5. Validasi dengan pewarnaan Masson Fontana untuk Pengecekan jumlah Melanin

Jaringan kulit di potong secara membujur untuk pengamatan histologis secara lengkap. Pembuatan preparat jaringan dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Jawa Tengah. Pengecatan melanin dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan Masson Fontana dengan tahapan pertama deparafinisasi slide jaringan dengan pemanasan cairan bouin ke 54-64°C. Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, dilanjutkan dengan 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. Apabila terdapat peningkatan jumlah melanin secara signifikan di bandingkan kelompok sehat yang di tandai dengan munculnya warna kehitaman pada bagian epidermis.⁷³

4.5.6. 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°C hingga proses analisis PCR dilakukan.

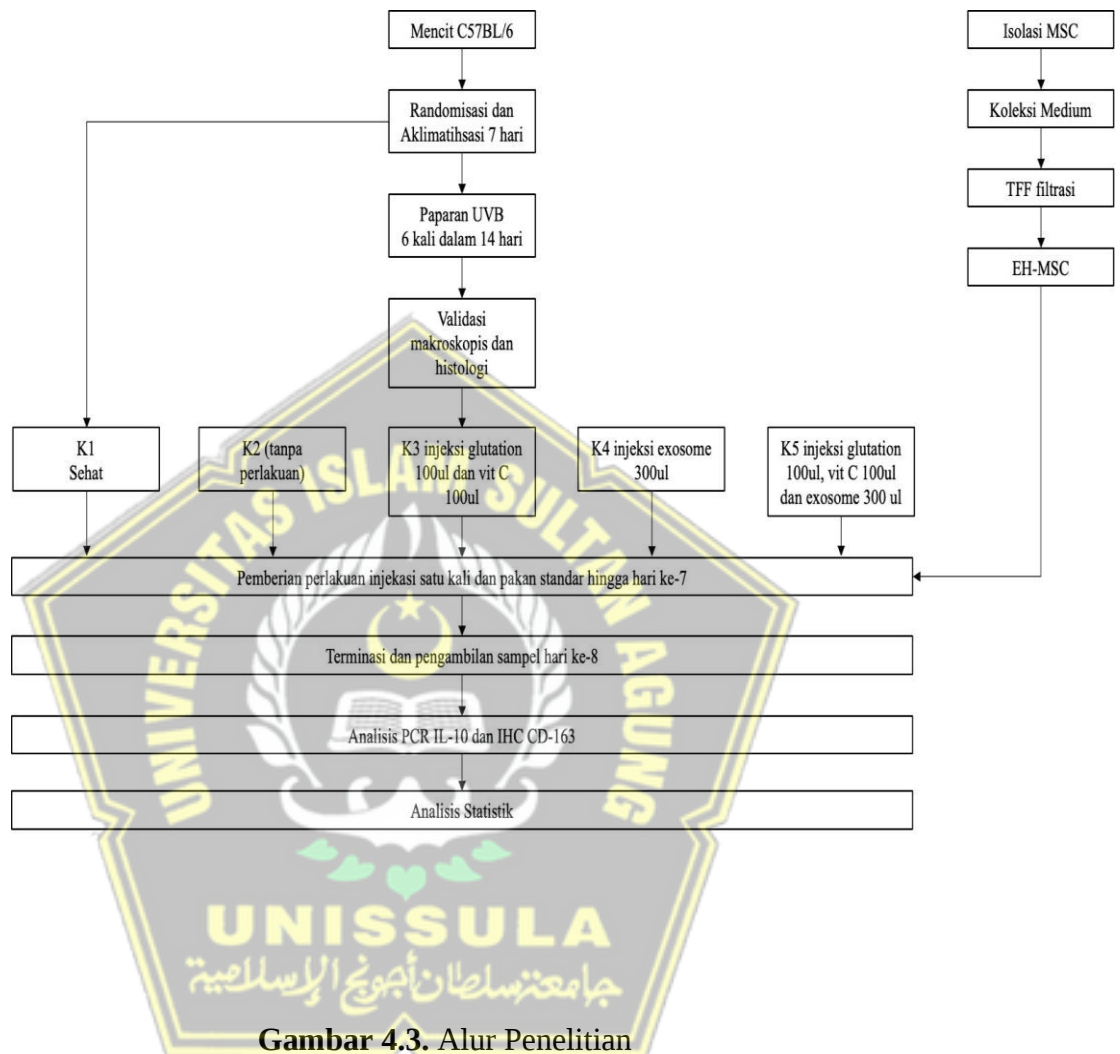
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Oktober-November 2024 di laboratorium Animal Model Research Center SCCR Indonesia.

4.7. Analisa Data

Data dianalisis ekspresi IL-10 dan CD163 menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas. Rata-rata hasil ekspresi IL-10 didapatkan normal dan tidak homogen ($P > 0,05$), sehingga dilakukan uji beda uji *One Way Anova* ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Data ekspresi CD163 didapatkan normal dan homogen ($P > 0,05$), sehingga dilakukan uji beda uji *One Way Anova* ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

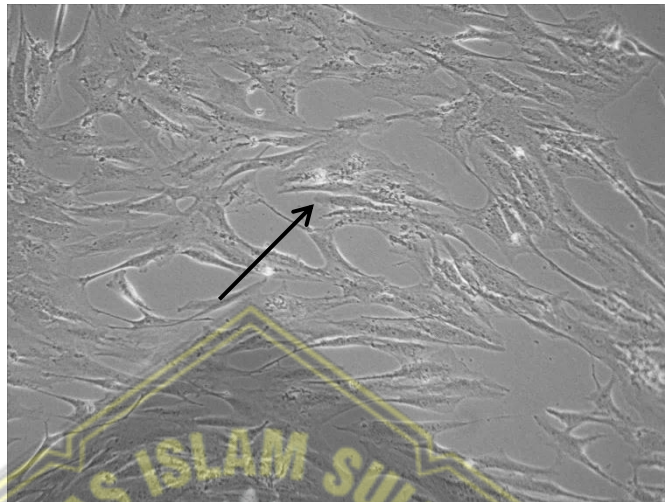
Riset ini bertujuan mengetahui pengaruh EH-MSCs (*Exosome mesenchymal stem cell hypoxia*) dan glutathione dengan vitamin c terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163 pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi. Riset dilaksanakan pada bulan September-Desember 2024 di laboratorium *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia. Penelitian eksperimental *in vivo* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 30 ekor Mencit jantan galur C57BL/6 sebagai subjek penelitian yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok 1 mencit sehat tanpa paparan UVB, Kelompok 2 kontrol negatif mencit dengan paparan UVB tanpa intervensi, kelompok 3 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 100ul dan vitamin C 100ul, kelompok 4 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan exosome 300ul, kelompok 5 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 100ul + vitamin C 100ul dan perlakuan exosome 300ul.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Validasi EH-MSCs (*Exosome mesenchymal stem cell hypoxia*)

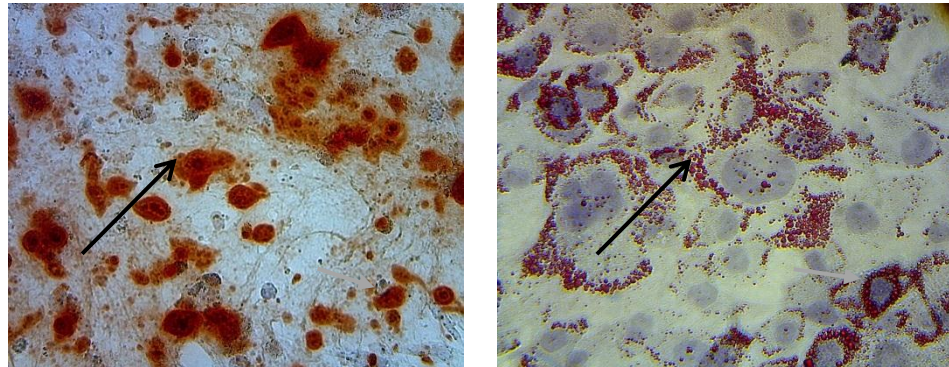
Penggunaan tali pusar mencit yang hamil, diisolasi MSCs ditambahkan media yang terdiri dari DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*), fungizone, penstrep, dan FBS, hasil isolasi kemudian dikultur dalam labu plastik. Ketika hasil kultur MSCs diperiksa di bawah

mikroskop, sel-sel dengan bentuk sel seperti gelendong yang menempel di dasar labu pada konfluensi 80%, seperti pada gambar 5.1.



Gambar 5.1. Hasil kultur MSCs.

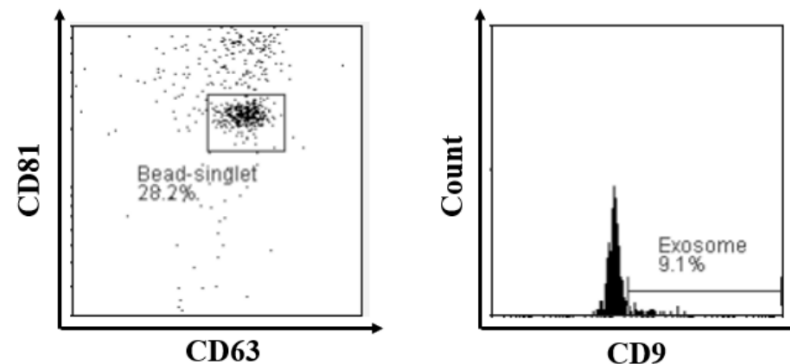
Validasi hasil proses isolasi sel MSCs dilakukan dengan melihat kemampuan MSsC untuk berkembang menjadi sel osteogenik dan adipogenik. Dalam uji diferensiasi adipogenik, pewarnaan *oil red O* digunakan untuk menunjukkan terbentuknya lipid droplet berwarna merah. Terbentuknya endapan kalsium terlihat jelas pada warna merah dan ditunjukkan dengan uji diferensiasi osteogenik menggunakan pewarnaan *Alizarin red*.



Gambar 5.2. Uji diferensiasi adipogenik, pewarnaan oil red O uji diferensiasi osteogenik menggunakan pewarnaan Alizarin red.

Hasil isolasi MSCs hipoxia menunjukkan kemampuan untuk mengekspresikan berbagai penanda permukaan khusus, yang dikonfirmasi oleh *flow cytometry*. MSC mengekspresikan CD45 (97,6%), CD31 (97,7%), CD90 (1,5%), dan CD29 (3,2%).

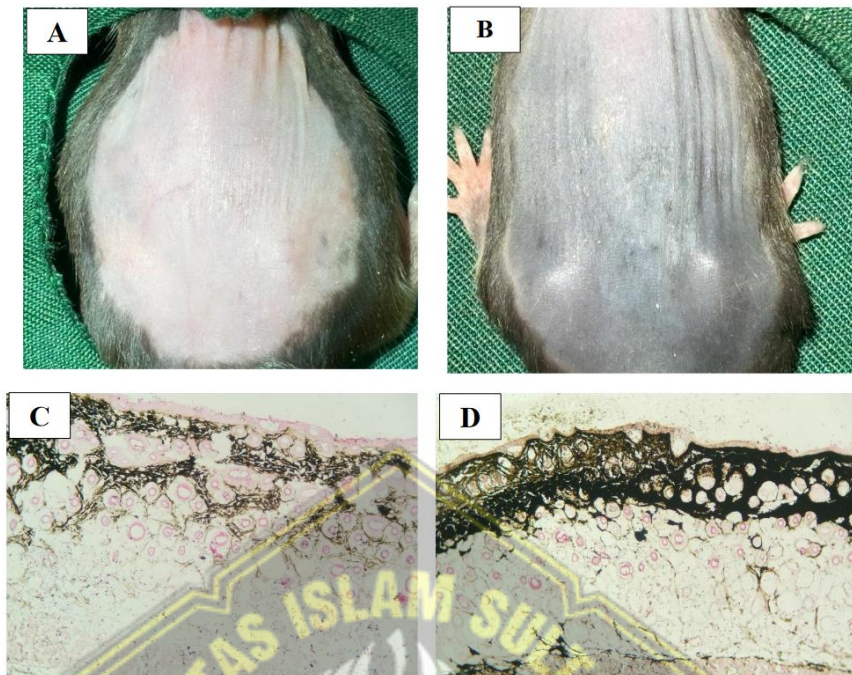
Penelitian ini melakukan isolasi terhadap MSCs untuk mendapatkan MSCs murni menggunakan sekretom yang diisolasi dari MSCs prekondisi hipoksia 5% konsentrasi O_2 menggunakan *Tangential flow filtrasi* (TFF), berdasarkan *molecular weight cut-off*, maka molekul berukuran 100-500 kDa didapatkan mengandung *exosome*.⁷⁴⁻⁷⁶ EH-MSCs tervalidasi dengan menggunakan *flowcytometry* untuk melihat kandungan marker *exosome* yang terbaca yaitu CD63, CD81, dan CD9. Hasilnya, jumlah *exosome* yang terbaca positif menggunakan marker CD81, CD63 dan CD9.



Gambar 5.3. Validasi exosome terhadap ekspresi marker CD81, CD63 dan CD9.

5.1.2. Validasi makroskopis dan histologi jaringan kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi

Validasi makroskopis bertujuan untuk memastikan bahwa paparan UVB berhasil menginduksi hiperpigmentasi pada kulit mencit, serta untuk mendokumentasikan perubahan fisik yang dapat diukur atau diamati secara visual. Hal ini penting untuk mengevaluasi keberhasilan model hiperpigmentasi. Analisis makroskopis dilakukan dengan membandingkan kondisi mencit setelah paparan UVB dengan kelompok kontrol. Hasil pengamatan yang dilakukan terjadi perubahan warna kulit (seperti penggelapan) pada area yang dipapar UVB, Jika dibandingkan dengan kulit yang tidak dipapar atau kulit mencit kontrol, seperti gambar makroskopis berikut.



Gambar 5.4. Makroskopis dan morfologi kulit mencit yang dipapar UVB selama 14 hari.

Validasi hasil pewarnaan *Masson fontana* pada sampel kulit pada kelompok perlakuan yang dipapar UVB menunjukkan hasil warna hitam pada bagian melanosit kulit. Sintesis melanin berlebihan menginduksi kerusakan kulit dan hiperpigmentasi. Melanin dapat menyerap radiasi UVB dan memberikan fotoproteksi serta berinteraksi dengan keratinosit dalam proses sintesis melanin.⁷⁷ Akumulasi melanin yang berlebihan menyebabkan gangguan hiperpigmentasi pada kulit. Perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit berupa meningkatnya jumlah melanin seperti pada hasil analisis pewarnaan *Masson Fontana*.

5.1.3. Hasil analisis ekspresi gen IL-10 dan CD-163 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi

Hasil analisis ekspresi IL-10 pada kulit mencit dengan metode RTq-PCR, kemudian dilakukan uji statistik normalitas data (*Shapiro wilk*) dan uji homogenitas data (*Levene's Test*) didapatkan hasil seperti pada tabel berikut:

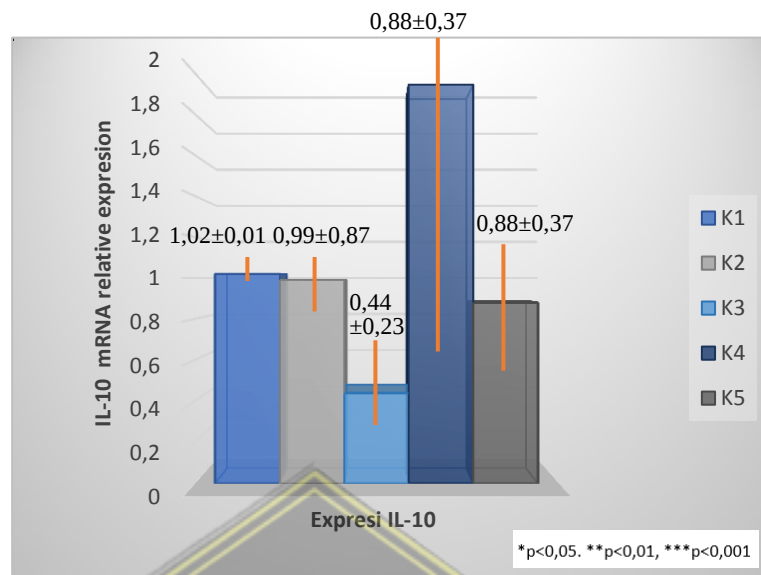
Tabel 5.1. Data hasil deskriptif ekspresi IL-10

Variabel	Kelompok					p
	K1	K2	K3	K4	K5	
	Rerata ±SD	Rerata ±SD	Rerata ±SD	Rerata ±SD	Rerata ±SD	
Ekspresi gen IL-10	1,02 ± 0,01	0,99 ± 0,40	0,44 ± 0,23	1,94 ± 2,06	0,88 ± 0,37	
<i>Saphiro wilk</i>	0,167	0,870	0,918	0,152	0,315	
<i>Levene's Test</i>						0,002
<i>Oneway Anova</i>						0,135

Keterangan:

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

Hasil rata rata ekspresi gen IL-10 didapatkan nilai tertinggi pada kelompok K4 $1,94 \pm 2,06$, pada kelompok K3 didapatkan nilai terendah $0,44 \pm 0,23$. kelompok K2 dengan nilai $0,99 \pm 0,87$, dan kelompok K5 ekspresi gen IL-10 dengan nilai $0,88 \pm 0,37$, seperti pada grafik berikut.



Gam bar 5.5. Grafik ekspresi IL-10 pada tiap kelompok

Perbandingan ekspresi IL-10 dengan hasil statistik parametrik dengan uji *One Way Anova* 0,135 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan karena nilai $p > 0,05$, namun secara klinis kelompok injeksi EH-
MSC (K4) menunjukkan ekspresi gen IL-10 lebih tinggi dibandingkan dosis kombinasi K5 dan K3 pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

5.1.4. Hasil analisis ekspresi CD-163 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi

Hasil analisis ekspresi CD-163 pada kulit mencit diperoleh dengan metode imunohistokimia terlebih dahulu dilakukan uji statistik normalitas dan homogenitas seperti pada tabel berikut:

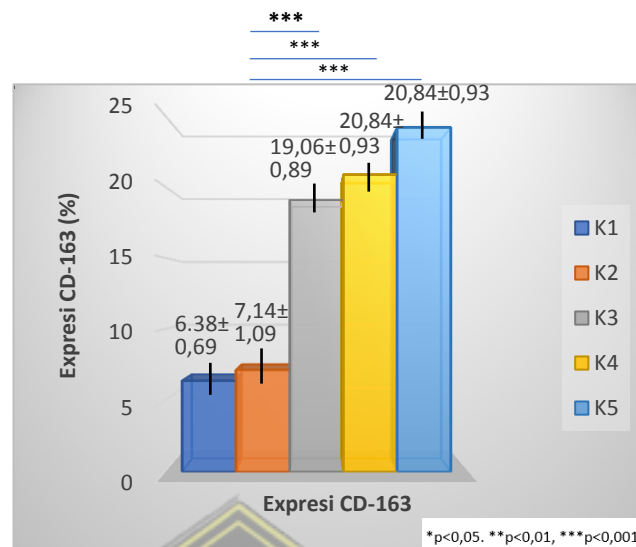
Tabel 5.2. Data hasil deskriptif ekspresi CD-163 dan uji parametrik
One way anova

Variabel	Kelompok					p
	K1 Rerata $\pm$ SD n=6	K2 Rerata $\pm$ SD n=6	K3 Rerata $\pm$ S D n=6	K4 Rerata $\pm$ SD n=6	K5 Rerata $\pm$ SD n=6	
Ekspresi gen CD-163 (%)	6,38 $\pm$ 0,69	7,14 $\pm$ 1,09	19,06 $\pm$ 0,89	20,84 $\pm$ 0,93	24,14 $\pm$ 0,94	
<i>Saphiro wilk</i>	0,558	0,879	0,943	0,738	0,326	
<i>Levene's Test</i>						0,844
<i>Oneway Anova</i>						0,000

Keterangan:

- *Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)
- *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)
- *One way anova* ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

Hasil rata rata didapatkan nilai tertinggi pada kelompok K5 24,14 $\pm$ 0,94, kelompok K4 dengan nilai 20,84 $\pm$ 0,93, kelompok K3 19,06 $\pm$ 0,89 dan kelompok K2 7,41 $\pm$ 1,09 sementara kelompok K1 didapatkan ekspresigen CD-163 dengan nilai terendah 6,38 $\pm$ 0,94, seperti tergambar pada grafik 5.6. Hasil analisis uji *One Way Anova* menunjukkan hasil yang signifikan dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$), sehingga disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan pada semua kelompok perlakuan terhadap ekspresi CD-163.



Gambar 5.6. Grafik ekspresi CD-163 pada tiap kelompok

Hasil yang signifikan ekspresi CD-163 dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk melihat perbandingan antar dua kelompok terhadap ekspresi CD163 pada kulit mencit model hiperpigmentasi. Hasil perbandingan antar dua kelompok dilampirkan pada tabel 5.3:

Tabel 5.3. Uji Post Hoc LSD CD-163 pada masing-masing kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
K1	K2	0.166
	K3	*0.000
	K4	*0.000
	K5	*0.000
K2	K3	*0.000
	K4	*0.000
	K5	*0.000
K3	K4	*0.003
	K5	*0.000
K4	K5	*0.000

Keterangan $p < 0,05$ * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Pada penelitian ini didapatkan hasil EH-MSC lebih tinggi terhadap ekspresi CD163 pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi secara signifikan pada dosis kombinasi injeksi exosome dan glutathion dengan vitamin C pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

5.2. Pembahasan

Penelitian ini melakukan eksperimen terhadap pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin c terhadap ekspresi gen IL-10 dan CD163 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi. Ekspresi gen IL-10 serta CD-163 pada kondisi hiperpigmentasi berperan dalam respon inflamasi dan imunoregulasi. IL-10 adalah sitokin anti-inflamasi yang dapat meningkatkan aktivitas makrofag tipe M2, yang sering ditandai dengan ekspresi CD-163. CD-163 sendiri adalah reseptor spesifik pada makrofag M2 yang berperan dalam fungsi imun anti-inflamasi.²⁷⁻²⁹

Paparan UVB yang menginduksi stres oksidatif merangsang pelepasan IL-10, terutama oleh keratinosit dan sel imun, sebagai mekanisme untuk membatasi inflamasi, mengaktifasi jalur NF- κ B dan MAPK yang berkontribusi pada regulasi IL-10. IL-10 menekan aktivitas sel imun proinflamasi, seperti Th1 dan Th17, serta mengurangi produksi sitokin proinflamasi (IL-6, TNF- α). Peningkatan IL-10 akibat paparan UVB juga mendorong diferensiasi makrofag menjadi M2 dan meningkatkan ekspresi CD163. CD163 berperan dalam membersihkan debris jaringan yang rusak akibat UVB.

Hasil penelitian Scuteri *et al.* 2018 melaporkan pada kondisi mencit model hiperpigmentasi akibat paparan UVB dan diberi perlakuan injeksi exosome (K4)

secara signifikan meningkatkan ekspresi IL-10. Molekul bioaktif pada exosome termasuk miRNA dan protein anti-inflamasi, mempolarisasikan makrofag ke fenotipe M2. Makrofag M2 dikenal memproduksi IL-10 dalam jumlah besar sebagai bagian dari fungsi anti-inflamasi untuk mengatur regenerasi jaringan.⁷⁶ Exosome menginduksi ekspresi IL-10 melalui jalur sinyal seperti STAT3. Jalur STAT3 ini penting dalam meningkatkan produksi IL-10 pada berbagai sel imun, termasuk keratinosit dan makrofag, pada kejadian hiperpigmentasi, peningkatan IL-10 dapat membantu mengurangi kerusakan inflamasi, yang berpotensi mencegah hiperstimulasi melanogenesis.⁷⁸ Wu *et al.* 2021 menyatakan peningkatan IL-10 dapat membantu mengurangi kerusakan inflamasi, yang berpotensi mencegah hiperstimulasi melanogenesis. Exosome juga menurunkan ekspresi sitokin pro-inflamasi, penurunan ini menciptakan lingkungan imun yang lebih kondusif untuk produksi IL-10, sehingga mengurangi inflamasi kronis yang sering terkait dengan hiperpigmentasi.⁷⁹ IL-10, melalui exosome, dapat menghambat jalur inflamasi yang memengaruhi melanogenesis. Dengan mengurangi stres oksidatif dan inflamasi lokal, IL-10 dapat mencegah aktivasi berlebihan MITF, regulator utama dalam sintesis melanin.¹ Exosome dapat mengangkut microRNA dan protein yang meningkatkan atau menurunkan ekspresi IL-10, sebuah sitokin anti-inflamasi yang membantu mengurangi peradangan dan menenangkan respons imun yang berlebihan.^{51,53,54} Hal ini sangat bermanfaat dalam mengatasi hiperpigmentasi yang disebabkan oleh inflamasi.⁵⁴⁻⁵⁶

Hasil ekspresi IL-10 pada kelompok injeksi EH-MSC (K4) menunjukkan nilai lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya, Kelompok EH-MSC Memiliki

Efek Imunomodulator yang lebih kuat, diketahui memiliki potensi imunomodulator yang kuat. Exosome ini mengandung berbagai molekul bioaktif seperti RNA, protein, dan lipid yang dapat memodulasi aktivitas sel imun, termasuk meningkatkan ekspresi IL-10. IL-10 adalah salah satu mekanisme utama dalam pengurangan inflamasi, dan efek EH-MSC dapat bekerja melalui stimulasi makrofag M2 atau sel T regulator (Treg) yang meningkatkan produksi IL-10.⁸⁰ Sedangkan pada kelompok glutathione dan vitamin C (K3) maupun kelompok kombinasi exosome, glutathione dan vitamin C menunjukkan nilai lebih rendah. Glutathione dan vitamin C adalah antioksidan kuat yang bertindak untuk menetralkan radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif. Meskipun memiliki manfaat protektif terhadap kerusakan sel, mereka tidak secara langsung memengaruhi jalur produksi IL-10. Dengan demikian, kelompok ini menunjukkan nilai IL-10 yang lebih rendah dibandingkan dengan EH-MSC karena peran mereka lebih fokus pada pengurangan stres oksidatif daripada regulasi sitokin anti-inflamasi.

Kombinasi Exosome, Glutathione, dan Vitamin C, dalam kelompok ini, meskipun exosome hadir, efek imunomodulatornya mungkin tereduksi karena interaksi dengan glutathione dan vitamin C. Kombinasi ini mungkin mengarahkan respons imun lebih ke arah mengurangi stres oksidatif tanpa memberikan sinyal kuat untuk produksi IL-10. Selain itu, adanya potensi efek antagonis atau kompetisi di antara molekul bioaktif ini dapat menghambat optimalisasi efek masing-masing.

Namun pada kelompok sehat (K1) dan kelompok terpapar UVB tanpa perlakuan cenderung lebih tinggi. Produksi IL-10 terjadi sebagai bagian dari homeostasis alami tanpa gangguan dari faktor eksternal. Hal ini menunjukkan kondisi optimal untuk produksi sitokin anti-inflamasi. Pada Kelompok UVB Tanpa Perlakuan, tubuh secara alami mencoba menyeimbangkan efek inflamasi UVB dengan meningkatkan sitokin anti-inflamasi seperti IL-10. Namun, tanpa perlakuan tambahan (seperti exosome atau antioksidan), efek ini hanya bersifat kompensasi parsial.

Pengaruh pada jalur inflamasi yang lebih kuat misalnya jalur inflamasi proinflamasi $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β) lebih dominan menyebabkan ekspresi IL-10 menjadi terhambat. Aktivasi IL-10 memerlukan jalur sinyal spesifik (STAT3). Jika jalur ini terganggu, IL-10 tidak akan bekerja efektif. Perlakuan yang menyebabkan efek pada IL-10, penting untuk mengevaluasi ulang mekanisme kerja bahan dan jalur inflamasi yang relevan.⁸⁰⁻⁸⁴

Hasil penelitian dengan injeksi EH-MSC dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen CD-163 pada model mencit hiperpigmentasi, hasil menunjukkan bahwa perlakuan injeksi EH-MSC dan glutathione dengan vitamin C menghasilkan ekspresi gen CD-163 tertinggi, peningkatan ekspresi CD163 pada kondisi hiperpigmentasi kulit yang dipapar sinar UVB terutama terkait dengan peran makrofag yang mengalami aktivasi dan polarisasi ke arah fenotipe M2 anti-inflamasi. CD163 adalah reseptor scavenger yang diekspresikan oleh makrofag M2 dan berfungsi dalam proses fagositosis, pengurangan peradangan, serta penyembuhan jaringan.^{85,86}

Ekspresi CD163 tertinggi pada kombinasi exosome, glutation, dan vitamin C dibandingkan exosome tunggal atau kombinasi glutation-vitamin C terjadi karena efek sinergi yang lebih kuat dari ketiganya dalam. Glutation dan vitamin C menekan stres oksidatif, Exosome memodulasi imun secara langsung, Kombinasi ketiganya mendukung perbaikan jaringan dan regenerasi. Exosome tunggal tetap kuat sebagai imunomodulator, tetapi efeknya terbatas tanpa dukungan antioksidan untuk menurunkan ROS. Sementara itu, kombinasi glutation dan vitamin C lebih lemah karena kurangnya kemampuan langsung untuk menginduksi makrofag M2 seperti exosome.

Penelitian Han *et al.* 2022 menunjukkan bahwa makrofag tipe M2, yang ditandai dengan ekspresi CD163, berperan dalam meningkatkan hiperpigmentasi kulit melalui interaksi dengan melanosit. Dalam sebuah studi, melanosit yang dikultur bersama makrofag M2 mengalami peningkatan produksi melanin secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa makrofag M2 dapat mendorong hiperpigmentasi pada area kulit yang mengalami kerusakan selama proses perbaikan jaringan.⁸⁷ Pada paparan UVB, produksi stres oksidatif dan peradangan lokal dapat merangsang makrofag untuk mengadopsi fenotipe M2, yang secara langsung meningkatkan ekspresi CD163. Jalur sinyal yang relevan melibatkan aktivasi faktor transkripsi seperti STAT3, yang dipicu oleh IL-10 atau TGF- β , dua sitokin anti-inflamasi yang sering meningkat dalam mikroenvironment inflamasi. Faktor ini selanjutnya meningkatkan ekspresi gen CD163 untuk mengatasi kerusakan jaringan dan memfasilitasi regenerasi. Selain itu, injeksi exosome, terutama EH-MSC memperkuat respons ini. Exosome membawa

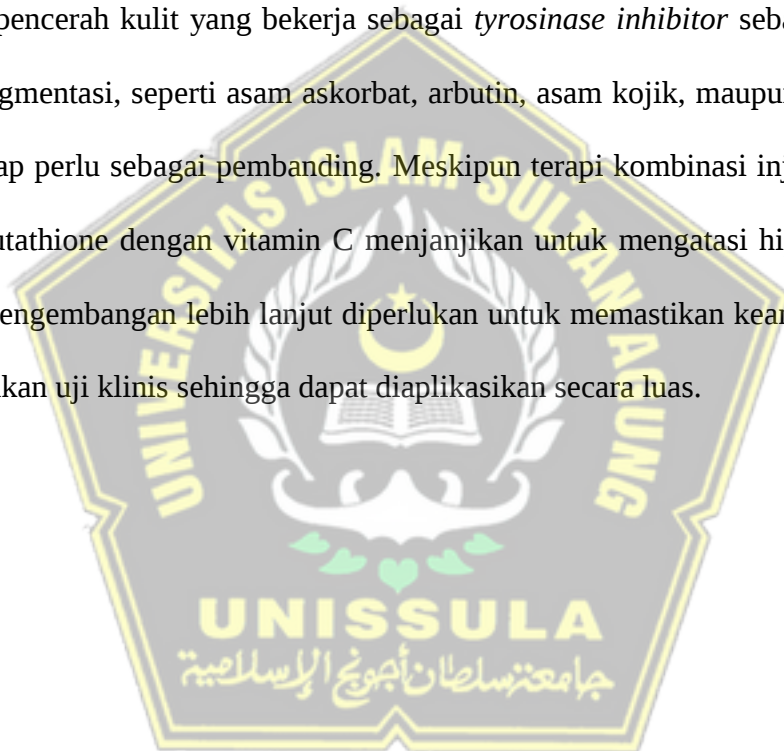
mikroRNA, protein, dan lipid bioaktif yang dapat merangsang makrofag untuk beralih ke fenotipe M2 dan meningkatkan ekspresi CD163. Salah satu mekanisme melibatkan transfer molekul seperti TGF- β atau mikroRNA yang menekan pro-inflamasi dan meningkatkan aktivitas anti-inflamasi.^{88,89}

Peradangan kronis dan stres oksidatif adalah faktor utama yang merangsang produksi melanin berlebihan. Dengan menginduksi makrofag M2 dan ekspresi CD163, proses peradangan bisa diredam dan stres oksidatif berkurang, yang pada akhirnya menurunkan stimulasi melanosit untuk memproduksi melanin. Pendekatan terapeutik yang meningkatkan ekspresi CD163, seperti penggunaan vitamin C dan glutathione, dapat membantu mengurangi hiperpigmentasi dengan menurunkan peradangan dan stres oksidatif di kulit.^{31,32} Vitamin C dan glutathione bekerja sinergis dengan meningkatkan jalur Nrf2 dan mengurangi jalur NF- κ B, yang mendukung ekspresi CD163 dan fungsi anti-inflamasi serta antioksidannya. Dengan demikian, CD163 memainkan peran penting dalam mengatasi hiperpigmentasi melalui modulasi respon inflamasi dan kapasitas antioksidan, membantu menyeimbangkan produksi melanin dan menjaga kesehatan kulit.³¹⁻³³

Pada kondisi hiperpigmentasi, stres oksidatif akibat paparan UV dapat memicu produksi IL-10 untuk meredam inflamasi. Namun, ekspresi IL-10 yang meningkat juga dapat mendukung peningkatan aktivitas makrofag CD-163 yang berperan dalam remodeling jaringan, termasuk produksi mediator yang dapat memengaruhi melanogenesis. Penelitian menunjukkan bahwa CD-163 dapat membantu menekan respons inflamasi lokal yang diinduksi oleh kerusakan kulit akibat UV, Secara keseluruhan, IL-10 dan CD-163 berperan dalam menciptakan

lingkungan imun yang lebih tolerogenik pada kulit yang mengalami kerusakan akibat UV, yang secara tidak langsung dapat memengaruhi proses hiperpigmentasi melalui mekanisme pengaturan inflamasi dan regenerasi jaringan.

Penelitian ini tidak menggunakan kelompok perlakuan obat standar yang untuk mengobati hiperpigmentasi, tambahan kelompok perlakuan menggunakan bahan pencerah kulit yang bekerja sebagai *tyrosinase inhibitor* sebagai pencegah hiperpigmentasi, seperti asam askorbat, arbutin, asam kojik, maupun hidrokuinon dianggap perlu sebagai pembanding. Meskipun terapi kombinasi injeksi exosome dan glutathione dengan vitamin C menjanjikan untuk mengatasi hiperpigmentasi kulit, pengembangan lebih lanjut diperlukan untuk memastikan keamanan dengan melakukan uji klinis sehingga dapat diaplikasikan secara luas.



BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Simpulan

1. Pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin C tidak berpengaruh terhadap ekspresi gen IL-10 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.
2. Pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin C berpengaruh terhadap ekspresi gen CD163 mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

6.2. Saran

1. Penelitian selanjutnya menambahkan kelompok pembanding dengan obat standar menggunakan bahan pencerah kulit seperti asam askorbat, arbutin, asam kojik, maupun hidrokuinon
2. Penelitian berikutnya melakukan uji klinis dengan terapi kombinasi injeksi *exosome* dan glutathione dengan vitamin C untuk mengatasi hiperpigmentasi kulit.

DAFTAR PUSTAKA

1. 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
2. Wang XY, Guan XH, Yu ZP, et al. Human amniotic stem cells-derived exosomal 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
3. 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
4. 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
5. Lu W, Zhang J, Wu Y, Sun W, Jiang Z, Luo X. Engineered NF- κ B siRNA-encapsulating exosomes as a modality for therapy of skin lesions. *Front Immunol.* 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1109381
6. 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
7. Lingappan K. NF- κ B in oxidative stress. *Curr Opin Toxicol.* 2018;7:81-86. doi:10.1016/j.cotox.2017.11.002
8. Boo YC. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. *Antioxidants.* 2022;11(9). doi:10.3390/antiox11091663
9. Yokawa K, Kagenishi T, Baluška F. UV-B induced generation of reactive oxygen species promotes formation of BFA-induced compartments in cells of Arabidopsis root apices. *Front Plant Sci.* 2016;6(JAN2016). doi:10.3389/fpls.2015.01162
10. Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ, Chiang HM. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3 β -ol,

Isolated from *Antrodia camphorata*, on Hairless mouse skin. *Molecules*. 2016;21(9). doi:10.3390/molecules21091213

11. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(4):994-1001. doi:10.1038/jid.2008.332
12. Su CM, Wang L, Yoo D. Activation of NF- κ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci Rep*. 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-92941-2
13. Narayan Biswal B, Narayan Das S, Kumar Das B, Rath R. Alteration of cellular metabolism in cancer cells and its therapeutic. *Journal of oral and Maxillofacial Pathology*. 2017;21(3):244-251. doi:10.4103/jomfp.JOMFP
14. Sinee W, Siriwan T, Phanupong P, Praavit A. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. Published online 2017:147-153.
15. 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>
16. 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
17. Wan S, Liu Y, Shi J, Fan D, Li B. Anti-Photoaging and Anti-Inflammatory Effects of Ginsenoside Rk3 During Exposure to UV Irradiation. *Front Pharmacol*. 2021;12. doi:10.3389/fphar.2021.716248
18. Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, et al. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med*. 2012;30(2):392-400. doi:10.3892/ijmm.2012.1011
19. Su VYF, Lin CS, Hung SC, Yang KY. Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ b pathway in endotoxin- induced acute lung injury. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9). doi:10.3390/ijms20092208
20. Trisnadi S, Muhar AM, Putra A, Kustiyah AR. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate peritoneal adhesion through TGF- β

- inhibition. *Universa Medicina*. 2020;39(2):97-104. doi:10.18051/univmed.2020.v39.97-104
21. Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain (United Kingdom)*. 2019;23(5):874-883. doi:10.1002/ejp.1353
 22. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, et al. Screening for skin cancer US preventive services task force recommendation statement. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2016;316(4):429-435. doi:10.1001/jama.2016.8465
 23. Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2009;4:551-579. doi:10.1146/annurev.pathol.3.121806.151541
 24. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442
 25. 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
 26. Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;174(3):299-306. doi:10.1016/j.resp.2010.08.019
 27. 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
 28. Pankajakshan D, Agrawal DK. *Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration*.
 29. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7(1). doi:10.1038/cddis.2015.327
 30. 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

31. 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
32. Dokka S, Shi X, Leonard S, et al. *Interleukin-10-Mediated Inhibition of Free Radical Generation in Macrophages.* Vol 280. <http://www.ajplung.org>
33. A. Letourneau P. Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Regulate Leukocyte-Endothelial Interactions and Activation of Transcription Factor NF-Kappa B. *J Tissue Sci Eng.* 2011;01(S3). doi:10.4172/2157-7552.s3-001
34. Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappa B activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol.* 2004;135:64-73. doi:10.1046/j.1365-2249.2004.02342.x
35. 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
36. Moolla S, Miller-Monthrope Y. Dermatology: how to manage facial hyperpigmentation in skin of colour. *Drugs Context.* 2022;11:1-14. doi:10.7573/dic.2021-11-2
37. Tanaka K, Asamitsu K, Uranishi H, et al. *Protecting Skin Photoaging by NF-B Inhibitor.* Vol 11.; 2010.
38. 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
39. 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
40. 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

41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
46. Hanke J. *ROLE OF NF κ B AND BCL-2 IN IGFBP-3 MEDIATED INTRINSIC APOPTOSIS.*; 2017.
47. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, et al. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(7):850-859. doi:10.1016/j.bcp.2006.06.021
48. 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
49. 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
50. 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
51. 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

52. Altobelli GG, Van Noorden S, Balato A, Cimini V. Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Human Skin: Current Knowledge. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7. doi:10.3389/fmed.2020.00183
53. Cooper SJ, Bowden GT. *Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of Nuclear Factor-Kappa B (NF-KB) and Activator Protein-1 (AP-1) in UVB-Induced Skin Carcinogenesis*. Vol 7.; 2007.
54. Wölflle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(9):1081-1093. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.027
55. Gupta A, Kaur CD, Jangdey M, Saraf S. Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy. *Ageing Res Rev*. 2014;13(1):65-74. doi:10.1016/j.arr.2013.12.001
56. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation- mediated skin aging. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083974
57. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(1):1-19. doi:10.1016/j.jaad.2005.05.010
58. Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol*. 2019;28:23-27. doi:10.1111/exd.13818
59. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1). doi:10.1101/cshperspect.a015370
60. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol*. 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/930164
61. *Overview of Skin Aging and Photoaging DERMATOLOGY NURSING*. www.dermatologynursing.net
62. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(2):87-95. doi:10.1111/j.1468-2494.2007.00415.x
63. Hwang KA, Yi BR, Choi KC. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations . *Lab Anim Res*. 2011;27(1):1. doi:10.5625/lar.2011.27.1.1

64. 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
65. Shukla A, Maiti P. Nanomedicine and versatile therapies for cancer treatment. *MedComm (Beijing).* 2022;3(3). doi:10.1002/mco2.163
66. 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
67. 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
68. 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
69. 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
70. 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
71. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The role of $\text{tnf-}\alpha$ induced mscs on suppressive inflammation by increasing $\text{tgf-}\beta$ and il-10 . *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(10):1779-1783. doi:10.3889/oamjms.2018.404
72. 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
73. 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
74. 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

75. 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
76. 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
77. Desai SR. Hyperpigmentation therapy: A review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology.* 2014;7(8):13-17.
78. Cui HS, Joo SY, Cho YS, et al. Exosomes Derived from Hypertrophic Scar Fibroblasts Suppress Melanogenesis in Normal Human Epidermal Melanocytes. *Int J Mol Sci.* 2024;25(13). doi:10.3390/ijms25137236
79. Wu P, Zhang B, Han X, et al. HucMSC exosome-delivered 14-3-3 ζ alleviates ultraviolet radiation-induced photodamage via SIRT1 pathway modulation. *Aging (Alb any NY),* 13(8), 11542. Published online 2021.
80. Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1). doi:10.1186/s12974-016-0763-8
81. Pereira L, Font-Nieves M, Van den Haute C, Baekelandt V, Planas AM, Pozas E. IL-10 regulates adult neurogenesis by modulating ERK and STAT3 activity. *Front Cell Neurosci.* 2015;9(FEB). doi:10.3389/fncel.2015.00057
82. Singampalli KL, Balaji S, Wang X, et al. The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(July):1-15. doi:10.3389/fcell.2020.00636
83. 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
84. Wu WK, Llewellyn OPC, Bates DO, Nicholson LB, Dick AD. IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia. *Immunobiology.* 2010;215(9-10):796-803. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.025
85. Deng X, Li S, Zhu Y, et al. Correction to: Assessment of the Macrophage Scavenger Receptor CD163 in Mediating *Glaesserella parasuis* Infection of Host Cells (Veterinary Sciences, (2023), 10, 3, (235), 10.3390/vetsci10030235). *Vet Sci.* 2023;10(7). doi:10.3390/vetsci10070458

86. Komori H, Watanabe H, Shuto T, et al. α 1-acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway: Possible protection against hemolysis-induced oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(36):30688-30700. doi:10.1074/jbc.M112.353771
87. Han H, Kim Y, Mo H, et al. Preferential stimulation of melanocytes by M2 macrophages to produce melanin through vascular endothelial growth factor. *Sci Rep*. 2022;12(1):1-12. doi:10.1038/s41598-022-08163-7
88. Plevriti A, Lamprou M, Mourkogianni E, et al. The Role of Soluble CD163 (sCD163) in Human Physiology and Pathophysiology. *Cells*. 2024;13(20):1-18. doi:10.3390/cells13201679
89. Tagashira H, Miyamoto A, Kitamura SI, et al. UVB stimulates the expression of endothelin B receptor in human melanocytes via a sequential activation of the p38/MSK1/CREB/MITF pathway which can be interrupted by a French maritime pine bark extract through a direct inactivation of MSK1. *PLoS One*. 2015;10(6):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0128678

