

**PENGARUH PEMBERIAN *HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS* (HMSCs) TERHADAP EKSPRESI CD68
DAN KADAR TNF- α PADA TIKUS GALUR WISTAR
MODEL *COLLAGEN LOSS***

(Studi eksperimental *in vivo* pada tikus Wistar yang mengalami penurunan
kolagen akibat terpapar UV-B)

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

**Sri Umi Ati
MBK 2322010418**

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

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (HMSCs) TERHADAP EKSPRESI CD68 DAN KADAR TNF- α PADA TIKUS GALUR WISTAR MODEL *COLLAGEN LOSS* (Studi eksperimental *in vivo* pada tikus Wistar yang mengalami penurunan kolagen akibat terpapar UV-B)

Disusun oleh :
Sri Umi Ati
MBK2322010418

yang telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 15 Januari 2025
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

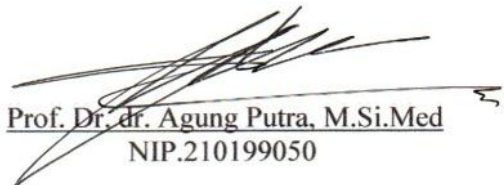
Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II



Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes
NIP. 220198045



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

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



Dr.dr. Eko Setiawan, Sp.B., Finacs
NIK : 210113160

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 kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/ tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 3 Febuari 2025



(Sri Umi Ati)

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis penulis berjudul, “Pengaruh Pemberian Hypoxia Mesenchymal Stem Cell terhadap Ekspresi CD68 dan kadar TNF- α (Studi Eksperimental In Vivo Pada Tikus Wistar yang mengalami Penurunan Kolagen Akibat Terpapar UV-B)” ini dapat terselesaikan.

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 sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., M. Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Biomedik
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr.dr. Eko Setiawan, Sp.B.,Finacs selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes. selaku dosen pembimbing I dan Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med. selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.

5. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan thesis.
6. Seluruh staf program Magister Biomedik FK UNISSULA yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama masa pendidikan penulis
7. Seluruh staf Stem Cell & Cancer Research (SCCR) yang telah meluangkan waktu untuk membantu penulis selama melakukan penelitian di dalam laboratorium
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, 03 Febuari 2025

(Sri Umi Ati)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat penelitian	5
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Makrofag-Tipe 1 (M1).....	10
2.1.1. Definisi Makrofag-Tipe 1 (M1).....	10
2.1.2. Peran dan Mekanisme Seluler Makrofag M1 dalam <i>Colagen Loss</i>	11
2.2. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)	14
2.2.1. Definisi TNF- α	14
2.2.2. Peran TNF- α pada penurunan kolagen	17
2.3. Kolagen.....	18
2.4. Mesenchymal Stem Cells (MSCs).....	19
2.4.1. Definisi MSCs	19
2.4.2. Karakteristik MSCs	20
Gambar 2.4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁵³	21
2.4.3. Peran MSCs	21
2.4.4. Hipoksia.....	22
2.5. Pengaruh HMSCs terhadap Ekspresi CD68 dan Kadar TNF- α	22
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	25
3.1. Kerangka Teori.....	25
3.2. Kerangka Konsep	28
3.3. Hipotesa.....	28
BAB IV METODE PENELITIAN	29
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	29
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	30

4.2.1.	Variabel Penelitian.....	30
4.2.2.	Definisi Operasional	31
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	33
4.3.1.	Subyek Penelitian	33
4.3.2.	Sampel Penelitian	34
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel	34
4.3.4.	Besar Sampel	36
4.4.	Alat dan Bahan	36
4.4.1.	Alat	36
4.4.2.	Bahan	37
4.5.	Prosedur Pelaksanaan Penelitian	38
4.5.1.	Perolehan Ethical Clearance	38
4.5.2.	Induksi Collagen Loss	39
4.5.3.	Isolasi MSCs dari <i>Umbilical Cord</i> (UC)	39
4.5.4.	Pemanenan dan Penghitungan MSCs	41
4.5.5.	Validasi MSCs <i>Imunophenotyping</i> dengan menggunakan <i>Flow Cytometry</i>	42
4.5.6.	Induksi Hipoksia MSCs	44
4.5.7.	Perlakuan pada Hewan Coba	45
4.5.8.	Uji Ekspresi CD68	45
4.5.9.	Uji Kadar TNF- α	48
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	49
4.7.	Analisis Data	49
4.8.	Alur Penelitian.....	51
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	52
5.1.	Hasil Penelitian.....	53
5.1.1.	Validasi Hewan Coba yang Diberi Paparan Sinar UV-B	53
5.1.2.	Morfologi dan Validasi Uji Diferensiasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSCs)	55
5.1.3.	<i>Immunophenotyping Mesenchymal Stem Cell</i> (MSCs)	56
5.1.4.	Efek Pemberian HMSCs terhadap Ekspresi CD68 pada tikus Wistar Model <i>Collagen Loss</i>	57
5.1.5.	Efek Pemberian HMSCs terhadap Kadar TNF- α pada tikus Wistar Model <i>Collagen Loss</i>	60
5.2.	Pembahasan Hasil Penelitian.....	63
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	68
6.1.	Kesimpulan.....	68
6.2.	Saran	68
DAFTAR	PUSTAKA	69
LAMPIRAN		77

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	5
Tabel 4. 1. Reagen yang digunakan dalam analisis <i>flow cytometry</i> (Bühring <i>et al.</i> , 2007) ⁷⁰	44
Tabel 5.1. Ekspresi CD68 pada jaringan kulit setelah injeksi HMSCs.....	58
Tabel 5.2. Perbedaan Rerata Ekspresi Gen CD68 antar Dua Kelompok dengan Uji Post-Hoc Tamhane	59
Tabel 5.3. Kadar TNF- α pada jaringan kulit setelah injeksi MSCs	61
Tabel 5.4. Perbedaan Rerata kadar TNF-alpha antar Dua Kelompok dengan <i>Uji Post-Hoc LSD</i>	61



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Peran Makrofag dalam Proses Penurunan Kolagen ²⁵	13
Gambar 2.2.	Jalur pensinyalan <i>TNF-α</i> , <i>TNFR1</i> dan <i>TNFR2</i> ²⁹	16
Gambar 2.3.	Jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam <i>photoaging</i> yang dimediasi UV akibat aktivasi reseptor inflamasi ⁴⁵	18
Gambar 2.4.	Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁵³	21
Gambar 2.5.	Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs ⁵⁷	22
Gambar 3.1.	Kerangka Teori Penelitian	27
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep Penelitian	28
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian	30
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	51
Gambar 5.1.	Validasi Collagen Loss secara makroskopis dan mikroskopis dengan pewarnaan Masson Trichrome. Tikus sehat tidak terlihat kerutan (A), Tikus yang disinari UVB tanpa perlakuan terlihat banyak kerutan (B). Dominasi warna biru menunjukkan banyaknya kolagen di tikus sehat (C), menurunnya dominasi warna biru menunjukkan penurunan densitas kolagen di tikus yang terpapar UVB tanpa perlakuan (D).....	53
Gambar 5.2.	Gambaran Mikroskopik Morfologi MSCs konfluen 80% berbentuk spindle-like pada perbesaran 40x (A) dan hasil uji diferensiasi MSCs dengan medium kultur osteogenik (B) dan adipogenik (C) dengan perbesaran 400x.	56
Gambar 5.3.	Hasil Immunophenotyping MSCs terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31 dengan analisis flowcytometry.....	57
Gambar 5.4.	Grafik Ekspresi Relatif CD68 Pada Jaringan Kulit.....	59
Gambar 5.5.	Grafik kadar <i>TNF-α</i> pada jaringan kulit setelah pemberian injeksi MSCs	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearance</i>	77
Lampiran 2.	Surat Penelitian	78
Lampiran 3.	Dokumentasi Penelitian.....	81
Lampiran 4.	Hasil Pengujian SPSS.....	82



ABSTRAK

Latar belakang : Paparan kronik sinar UV B menimbulkan peningkatan kadar nitrit oksida (NO) dan *reactive oxygen species* (ROS) yang berdampak pada penurunan jumlah kolagen. Peristiwa penurunan jumlah kolagen akibat paparan sinar UV secara terus-menerus tersebut berkorelasi dengan Overekspresi ROS akibat sinar UV-B ini akan mengaktifkan jalur persinyalan *mitogen activated protein kinase* (MAPK) *pathway* dan aktivasi *nuclear factor kappa- β* (NF- κ) menginduksi transkripsi sitokin proinflamasi seperti TNF- α .

Metode penelitian : Penelitian eksperimental menggunakan desain penelitian berupa *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan tiap perlakuan. Subyek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar yang dibagi menjadi 5 perlakuan yang terdiri dari K1 tikus sehat, K2 kontrol negatif, K3 kontrol positif, perlakuan 1 dosis $2,5 \times 10^5$, dan perlakuan 2 dosis 5×10^5 . Kemudian data di analisis menggunakan Uji *One Way Anova* untuk mengetahui pengaruh dari tiap kelompok.

Hasil : Uji *One Way Anova* menunjukkan hasil ekspresi CD68 (<0.05), kemudian hasil kadar TNF- α (<0.05), kemudian uji *Pos Hoc Tamhane* kadar CD68 (<0.05) pada kelompok K1 vs K2, dan K5 vs K2. kemudian uji *Pos Hoc LSD* TNF- α (<0.05) pada kelompok K4 vs K2, dan K5 vs K2. Sehingga dalam penelitian ini H_0 diterima dan H_a ditolak.

Kesimpulan : Pemberian injeksi HMSCs secara subkutan menunjukkan dosis 5×10^5 sel (K5) dinilai lebih optimal karena menunjukkan hasil ekspresi CD68 dan kadar TNF- α mendekati kondisi normal, dan terdapat korelasi positif antara penurunan ekspresi CD68 dengan penurunan kadar TNF- α .

Kata Kunci : *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (HMSCS), ekspresi CD68, kadar TNF- α

ABSTRACT

Background : Chronic exposure to UV B rays causes an increase in nitric oxide (NO) and *reactive oxygen species* (ROS) levels which have an impact on decreasing the amount of collagen. The event of decreasing the amount of collagen due to continuous exposure to UV rays correlates with ROS overexpression due to UV-B rays will activate the *mitogen activated protein kinase* (MAPK) *pathway* and activation of the *nuclear factor kappa- β* (NF- κ B) inducing transcription of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α .

Methods : The experimental research used a research design in the form of a post test only control group with a complete random design method with five repetitions of each groups. The subject of this study was male rats of the Wistar strain which were divided into 5 groups consisting of K1 healthy rats, K2 negative control, K3 positive control, 1 dose injection 2.5×10^5 , and 2 doses injection 5×10^5 . Then the data was analyzed using the One Way Anova Test to determine the influence of each group.

Goals : The One Way Anova test showed the results of CD68 expression (<0.05), then the results of TNF- α levels (<0.05), then the Pos Hoc Tamhane test of CD68 levels (<0.05) in the K1 vs K2 groups, and K5 vs K2. then the TNF- α LSD Post Hoc test (<0.05) in the K4 vs K2, and K5 vs K2 groups. So in this study H_0 is accepted and H_a is rejected.

Conclusion : Subcutaneous administration of HMSCs showed that the dose of 5×10^5 cells (K5) was considered more optimal because it showed CD68 expression results and TNF- α levels were close to normal conditions, and there was a positive correlation between decreased CD68 expression and decreased TNF- α levels.

Keywords : Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (HMSCS), CD68 expression, TNF- α Levels

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sinar ultraviolet (UV) merupakan faktor utama penyebab penuaan eksogen. Paparan kronik sinar UV B menimbulkan peningkatan kadar nitrit oksida (NO) dan *reactive oxygen species* (ROS) yang berdampak pada penurunan jumlah kolagen. Peristiwa penurunan jumlah kolagen akibat paparan sinar UV secara terus-menerus tersebut berkorelasi pada proses penuaan yang lebih dikenal dengan istilah *Photoaging*. *Photoaging* menjadi permasalahan penuaan kulit yang sangat kompleks, dimana mengarah ke perubahan struktural, fisiologis kumulatif dan perubahan progresif di setiap lapisan kulit terutama pada area kulit yang terpapar cahaya¹⁻³. Paparan UV-B menyebabkan kerusakan sel yang memicu modulasi makrofag (CD68) sebagai bagian dari respons imun untuk membersihkan sel-sel yang mati dan rusak, serta mensekresikan sitokin-sitokin proinflamasi. Overekspresi ROS akibat sinar UV-B ini akan mengaktifkan jalur persinyalan *mitogen activated protein kinase* (MAPK) *pathway* dan aktivasi *nuclear factor kappa-β* (NF-κβ) menginduksi transkripsi sitokin proinflamasi seperti TNF-α. Pemberian *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (HMSCs) diketahui memiliki banyak manfaat untuk mengatasi beberapa masalah kesehatan, namun belum ditemukan studi yang melaporkan pengaruh pemberian HMSCs terhadap profil Makrofag M1 dengan kadar molekul inflamasi TNF-α khususnya pada kondisi *collagen loss*^{4,5}. Keunggulan pemberian

injeksi HMSCs dibanding dengan injeksi lain diantaranya karena HMSCs merupakan sel biologis yang tidak memiliki sifat imunogenisitas, serta tidak menimbulkan efek samping. Oleh karena itu, penelitian ini menjadi penting dilakukan untuk peneliti dapat mengkaji lebih lanjut pengaruh pemberian HMSCs terhadap ekspresi CD68 sebagai marker makrofag M1 dan kadar TNF- α pada tikus jantan galur Wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa sebanyak 83% orang berusia muda hingga dewasa mengalami penuaan dini akibat paparan UV-B yang berakibat munculnya kerutan dan penurunan elastisitas kulit. Riset klinis tersebut menunjukkan penuaan terjadi 40% pada orang dewasa dengan usia dibawah 55 tahun dengan tingkat perubahan sedang hingga parah⁶. Permasalahan kesehatan kulit akibat paparan sinar UVB terus meningkat pada setiap tahunnya, penelitian di Australia menunjukkan sebanyak 1.539 jiwa berusia 20–55 tahun mengalami *photoaging* dengan total prevalensi 72% pria dan 47% wanita pada usia dibawah 30 tahun⁷. Selain itu, studi epidemiologi secara berkelanjutan menunjukkan bahwa prevalensi *collagen loss* akibat paparan sinar UVB cenderung meningkat, terutama di wilayah-wilayah dengan tingkat paparan matahari yang tinggi, termasuk Indonesia. Populasi yang tinggal di daerah tropis atau yang sering terpapar sinar matahari secara langsung memiliki risiko lebih besar untuk mengalami degradasi kolagen yang signifikan. Prevalensi yang tinggi ini dapat

ditemukan pada kelompok usia yang beragam, mencakup dewasa muda hingga lanjut usia⁸.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa paparan UV-B menyebabkan ekspresi molekul-molekul inflamasi yang pada akhirnya mengarah pada degradasi kolagen. Paparan sinar UV-B juga mempengaruhi ekspresi makrofag pada sel-sel kulit. Infiltrasi makrofag yang secara terus menerus pada akhirnya menyebabkan kerusakan ECM dermis secara berkelanjutan karena pelepasan MMP dan ROS. Selain itu, makrofag yang teraktivasi juga akan mensekresikan molekul-molekul proinflamasi yang menyebabkan kerusakan pada sel dan jaringan yang semakin parah. Kemampuan imunomodulasi yang dimiliki HMSCs dilaporkan dapat menginduksi pelepasan sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan *growth factor* seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β), VEGF, *Platlet Derived Growth Factor* (PDGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) yang dapat menginduksi peningkatan kadar kolagen^{9,10}. IL-10 dan TGF- β yang diinduksi oleh HMSCs juga berkontribusi mampu mengendalikan kerusakan kulit akibat radiasi sinar UVB dengan menurunkan kadar ROS, menurunkan inflamasi dan menginduksi produksi kolagen.¹¹

Hingga saat ini peran HMSCs dalam meregulasi ekspresi makrofag dan pengaruhnya terhadap kadar molekul inflamasi TNF- α pada model *collagen loss* belum dikaji. Oleh karena itu, penelitian ini menjadi penting dilakukan untuk mengidentifikasi peran HMSCs terhadap ekspresi

makrofag M1 dengan profil CD68 dan kadar TNF- α pada tikus wistar model *collagen loss* yang diinduksi iradiasi UVB secara *in vivo*.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat dirumuskan adalah "Bagaimana pengaruh pemberian HMSCs terhadap ekspresi CD68 dan kadar TNF- α pada tikus model *collagen loss* dipapar sinar UV-B?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh pemberian HMSCs terhadap ekspresi makrofag M1 (CD68) dan kadar TNF- α pada tikus model *collagen loss* dipapar sinar UV-B.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain untuk :

- a. Mengetahui ekspresi CD68 pada tikus model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel dibandingkan control secara *in vivo*.
- b. Mengetahui kadar TNF- α pada tikus model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel dibandingkan control secara *in vivo*.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teori adalah memberikan ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian HMSCs terhadap ekspresi makrofag (M1) dan kadar TNF- α pada tikus model penurunan kolagen yang dipapar sinar UV-B.

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah :

1. Memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh HMSCs terhadap ekspresi makrofag (M1) dan kadar TNF- α pada Tikus Galur Wistar yang dipapar sinar UV-B.
2. Penelitian lebih lanjut diharapkan dapat diaplikasikan bagi masyarakat.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1	Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S <i>et al.</i>	Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentati	Hipoksia Stem Cell	Ekspresi SOD dan MMP1	Hipoksia MSCs meningkatkan ekspresi gen SOD dan menurunkan ekspresi MMP1

No	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
	2022 ⁵	on Rats.			
2	Se-Ra Park, Jae-Wan Kim, Hee-Sook Jun, Yoo Young Roh, Hwa-Yong Lee, In-Sun Hong, 2017 ¹³	Stem Cell and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing	Eksosom Stem cells	Proliferasi sel, keratinosit, dan epitel vaskular	MSCs meningkatkan kemampuan proliferasi sel kulit seperti fibroblast, keratinosit, dan epitel vascular, meningkatkan perbaikan kulit
3	He X, Dong Z, Cao Y, Wang H, Liu S, Liao L <i>et al</i> 2019 ⁴	MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing	Mesenchymal stem cell transplantation (MSCT)	Macrophage M2 (CD206)	Eksosom yang berasal dari MSCs dapat menginduksi polarisasi makrofag pada <i>wound site</i>
4	Yi You, Yu Tian, Zhaogan Yang, Junfeng Shi, Kwang Joo Kwak, Yuhao Tong, Jianhong Cao,	Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy	Eksoseluler vesicle MSCs	CollA1, Ekstrak seluler matriks.	Pemberian MSCs meningkatkan produksi collagen A1, dan mencegah degradasi ekstra seluler matriks

No	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
	Wei0Hsiang Hsu, 2023 ¹⁵				
5	Liang JX, Liao X, Li SH, Jiang X, Li ZH, Wu YD, Xiao LL, Xie GH, Song JX, Liu HW, 2020 ¹⁷	Antiaging Properties of Exosomes from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Photoaged Rat Skin	Adipose-derived stem cells (ADSCs)	Ekspresi mRNA kolagen tipe I dan III, MMP1 dan MMP3	Pemberian injeksi ADSCs mampu meningkatkan ekspresi mRNA kolagen tipe 1 dan 3, serta menurunkan ekspresi MMP1 dan MMP3.
6	Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. <i>Molecular Therapy</i> , 2018 ¹³	Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing	Stem Cell Secretome	Mekanisme <i>wound healing</i>	Stem Cell secretome memodulasi <i>signaling-cascade</i> PI3K/AKT dan FAK/ERK1/2 yang terlibat dalam migrasi dan proliferasi beberapa komponen seluler dermal selama perbaikan jaringan kulit.

Penelitian Zukhiroh et al., 2019 mengungkapkan HMSCs memberi pengaruh dalam peningkatan ekspresi gen SOD dan penurunan MMP1 pada Tikus model Hiperpigmentasi⁵. Pada penelitian ini akan mengkaji lebih jauh terkait dengan efikasi HMSCs tersebut terhadap ekspresi makrofag dan molekul inflamasi TNF- α pada Tikus model *collagen loss*. Penelitian Se-Ra Park et al., 2017 juga melaporkan bahwa MSCs meningkatkan kemampuan proliferasi sel seperti fibroblast, keratinosit, dan epitel vascular, dan meningkatkan perbaikan kulit¹³. Penelitian ini berbeda dengan penelitian tersebut, yang mana penelitian ini menggunakan MSCs yang di pre-kondisi hipoksia. Penelitian He et al., 2019 juga melaporkan bahwa *exosomes-derived MSCs* dapat menginduksi polarisasi makrofag dengan fenotip M2 pada area inflamasi⁴. Penelitian ini berbeda karena menggunakan MSCs yang di prekondisi hipoksia dan mengidentifikasi pengaruhnya terhadap profil makrofag M1. Penelitian Yi You et al., 2023 menemukan bahwa pemberian MSCs meningkatkan produksi collagen A1, dan mencegah degradasi ekstraseluler matriks.¹⁵ Penelitian Liang et al., 2020 melaporkan bahwa *Adipose-derived stem cells* (ADSCs) mampu meningkatkan ekspresi mRNA kolagen tipe 1 dan 3, serta menurunkan ekspresi MMP1 dan MMP3 sehingga secara signifikan menunjukkan perbaikan kulit akibat kerusakan yang disebabkan paparan sinar UV.¹⁷ Penelitian Park et al (2018) melaporkan bahwa *Stem cell secretome* memodulasi *signaling-cascade* PI3K/AKT dan FAK/ERK1/2 yang terlibat dalam migrasi dan proliferasi beberapa komponen seluler dermal selama perbaikan jaringan kulit.

Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana menggunakan *mesenchymal stem cells* akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model collagen loss yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi makrofag (M1) dan kadar $\text{TNF-}\alpha$.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Makrofag-Tipe 1 (M1)

2.1.1. Definisi Makrofag-Tipe 1 (M1)

Makrofag merupakan komponen seluler utama dari sistem imun bawaan (*innate*) yang secara umum dikaitkan dengan presentasi antigen dan pertahanan dalam melawan patogen. Makrofag termasuk dalam sistem fagosit mononuklear (MPS) yang berperan penting dalam memodulasi respons homeostatik, fagositosis sel apoptosis dan nekrosis, penyembuhan luka, dan perbaikan jaringan.¹⁸ Makrofag bersifat sangat plastis serta mampu meregulasi status aktivasinya sebagai respon sesuai isyarat atau stimulasi dari lingkungannya. Peristiwa tersebut dikenal dengan istilah polarisasi, hasil dari interaksi sel dengan sel, sel dengan molekul yang meregulasi fungsi makrofag pada jaringan. Berdasarkan fenotipe fungsionalnya, makrofag dibagi menjadi dua subset yaitu makrofag M1 yang berperan sebagai proinflamasi (*killer*) dan makrofag M2 yang berperan sebagai regulator atau anti-inflamasi (*builder*).¹⁹ Makrofag M1 diaktifkan secara klasik dari prekursor myeloid melalui stimulasi persinyalan inflamasi seperti interferon (IFN)- γ dan/atau tumor necrosis factor (TNF- α). Selain itu, aktivasi makrofag M1 ini berkaitan dengan respon adanya *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) termasuk

lipopolisakarida (LPS), flagella bakteri, dsRNA virus atau *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF).

CD68 merupakan marker spesifik sel myeloid yang diekspresikan pada permukaan sel makrofag. Marker permukaan sel yang umum digunakan untuk mengidentifikasi makrofag M1 mencakup MHC kelas II, CD68, B7-1/CD80, B7-2/CD86, dan iNOS. Makrofag M1 berperan aktif dalam aktivasi sel T dan produksi sitokin yang berperan dalam respons imun. Aktivasi makrofag M1 menyebabkan produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, tumor necrosis factor- α (TNF- α), dan nitric oxide synthase 2 (NOS2).²⁰

2.1.2. Peran dan Mekanisme Seluler Makrofag M1 dalam Collagen Loss

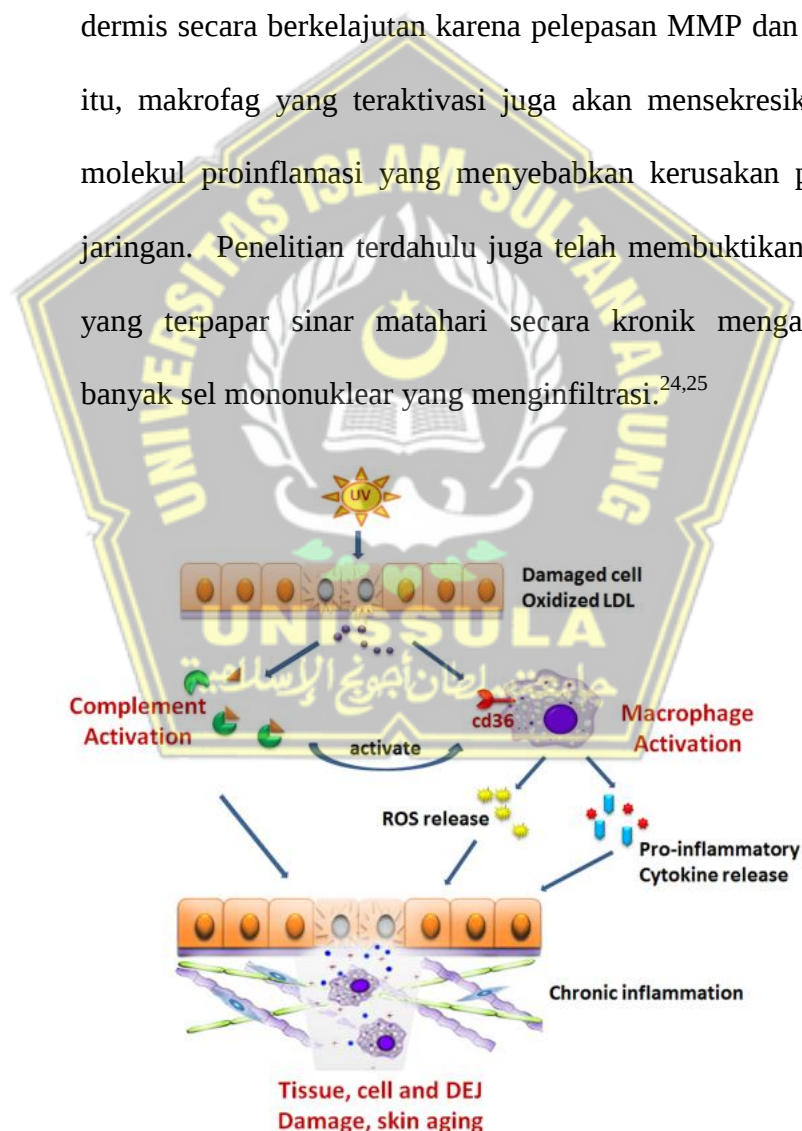
Kolagen loss merupakan penurunan kadar kolagen pada kulit yang disebabkan oleh paparan UVA dan UVB yang dapat menginduksi stres oksidatif pada kulit manusia dan menyebabkan kerusakan genetik temporal dan persisten, peningkatan regulasi aktivitas *activator protein* (AP)-1, dan peningkatan ekspresi MMP.^{21,22} Adanya sinar UV menginduksi produksi *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler berlebih dan menekan mekanisme antioksidan seluler. ROS tersebut kemudian bekerja dengan mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) dan *nuclear factor-kappa* β (NF-K β) yang berpuncak pada regulasi

transkripsi MMP, dan menghasilkan degradasi kolagen dan elastin, yang berlanjut ke *photoaging*.²³ *Photoaging* menyebabkan kulit menjadi kering, keriput, pigmentasi kulit bertambah gelap, serta kekencangan kulit berkurang.

Studi telah menunjukkan bahwa paparan sinar UVB (Ultraviolet B) dapat mempengaruhi ekspresi makrofag pada sel-sel kulit. Paparan sinar UV memicu infiltrasi neutrofil dalam epidermis dan dermis. Neutrofil yang teraktivasi berperan dalam *clearance* sel-sel terapoptosis akibat UV dan membunuh sel-sel kulit yang permukaan lemaknya teroksidasi. Pada proses ini terdapat beberapa enzim yang dilepaskan, meliputi neutrofil elastase, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), dan matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) yang berkontribusi terhadap proses *photoaging*. Menariknya, di antara MMPs yang diekspresikan pada kulit manusia normal, hanya tiga yang diinduksi secara signifikan sebagai respons terhadap penyinaran ultraviolet (UV), yaitu MMP-1, MMP-3, dan MMP-9.²³

Dalam hal ini, makrofag berperan utama karena makrofag mendominasi infiltrasi setelah beberapa jam pembersihan sel-sel terapoptosis dan lipid teroksidasi. Terdapat dua sumber makrofag yaitu dari aliran darah dan ekspansi prekursor monosit yang sebelumnya sudah ada di dermis. Makrofag mengekspresikan berbagai matrix metalloproteinase yang berkontribusi memicu

migrasi makrofag dalam kulit untuk mendegradasi *extracellular matrix* (ECM). Makrofag juga menghasilkan ROS intraseluler, yang mana dapat menginduksi transkripsi MMP di dermal fibroblast. Kerusakan kulit oleh UV secara berulang akan merepetisi siklus infiltrasi makrofag pada setiap paparannya. Infiltrasi makrofag yang secara terus menerus pada akhirnya menyebabkan kerusakan ECM dermis secara berkelanjutan karena pelepasan MMP dan ROS. Selain itu, makrofag yang teraktivasi juga akan mensekresikan molekul-molekul proinflamasi yang menyebabkan kerusakan pada sel dan jaringan. Penelitian terdahulu juga telah membuktikan bahwa kulit yang terpapar sinar matahari secara kronik mengandung lebih banyak sel mononuklear yang menginfiltrasi.^{24,25}



Gambar 2.1. Peran Makrofag dalam Proses Penurunan Kolagen²⁵

2.2. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)

2.2.1. Definisi TNF- α

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) adalah sitokin pleiotropik pada berbagai jenis sel yang berperan sebagai regulator utama dalam respon inflamasi pada beberapa penyakit, termasuk metabolik Sindrom.²⁶ TNF- α adalah protein homotrimer yang terdiri dari 157 asam amino, terutama dihasilkan oleh sel makrofag, limfosit T, dan NK aktif yang memicu serangkaian berbagai molekul inflamasi, termasuk sitokin dan kemokin.^{27,28} Secara umum, TNF- α mengikat reseptornya, terutama TNFR1 dan TNFR2, dan kemudian mentransmisikan sinyal molekuler sampai nukleus untuk meregulasi fungsi biologis seperti inflamasi dan apoptosis.²⁹

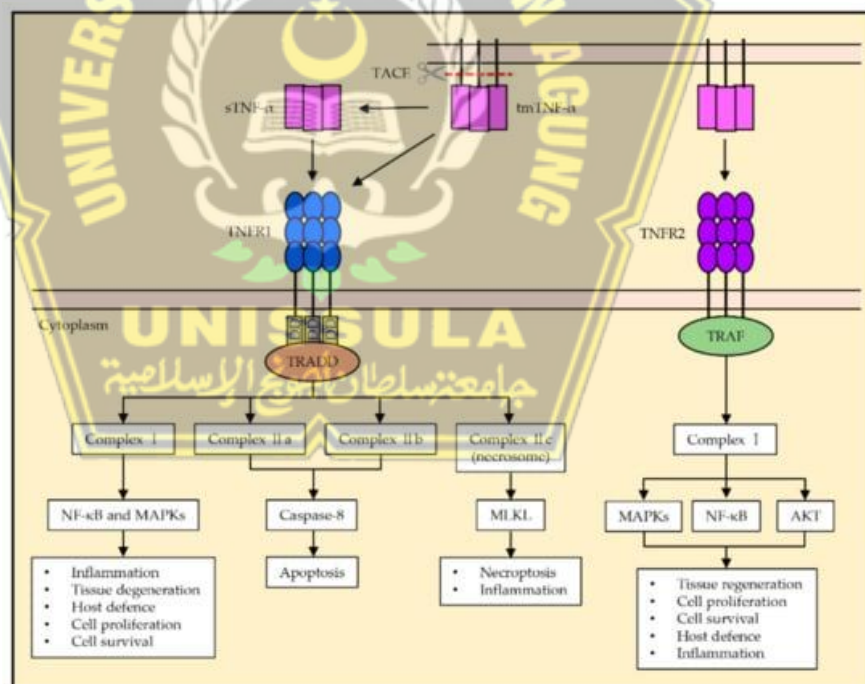
Ikatan antara TNF- α dan TNFR1 dapat memicu pembentukan kompleks pensinyalan yang berbeda, disebut sebagai kompleks I, IIa, IIb, dan IIc, yang menghasilkan respons seluler yang berbeda.^{29,30} Selama aktivasi kompleks I, TNFR1 yang teraktivasi berikatan dengan TNFR1-associated death domain protein (TRADD), diikuti oleh asosiasi dan interaksi berbagai komponen, termasuk *Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1 (RIPK1)*, faktor terkait TNFR 2 atau 5 (*TRAF2/5*), inhibitor celluler protein apoptosis 1 atau 2 (*cIAP1/2*), dan *Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC)*.³¹ Jalur pensinyalan ini menghasilkan aktivasi *Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)* dan *Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)*.

Hasil fungsional dari pensinyalan kompleks I dikenal sebagai induksi inflamasi, kelangsungan hidup dan proliferasi dan pertahanan kekebalan sel terhadap patogen.^{32,33}

Selain kompleks I yang tersusun di membran plasma, kompleks IIa, IIb, dan IIc tersusun di sitoplasma.³⁴ Aktivasi *TNFR1* juga akan mengaktifkan kompleks IIa terdiri dari *TRADD*, *RIPK1*, *TRAF2*, *cIAP1/2*, *pro-Caspase-8*, dan *Fas-Associated Protein With Death Domain (FADD)*.²⁹ Kompleks IIb memiliki komposisi yang sama dengan kompleks IIa dengan penambahan *RIPK*.²⁹ Pembentukan kompleks IIa dan IIb (juga dikenal sebagai apoptosom) yang mengaktifkan caspase-8 dan memicu apoptosis.³⁵ Kompleks IIc (dikenal sebagai nekrosom), tersusun atas *RIPK1* dan *RIPK3*, mengaktifkan *Mixed Lineage Domain Kinase (MLKL)*-like protein melalui fosforilasi yang dimediasi *RIPK3*, yang menginduksi nekroptosis dan inflamasi.³⁶

TNFR2 disarankan untuk diaktifkan sepenuhnya oleh *TNF- α* , terutama dalam konteks interaksi sel-ke-sel. Tidak seperti *TNFR1*, *TNFR2* tidak memiliki domain kematian sehingga tidak dapat menginduksi kematian sel terprogram secara langsung. Selama perakitan, *TNFR2* merekrut *TRAF2* bersama dengan *TRAF1*, *cIAP1*, dan *cIAP2*, dan kompleks ini memungkinkan aktivasi hilir *NF- κ B*, *MAPKs*, dan *protein kinase B (AKT)*.³⁷ Secara fungsional, *TNFR2* terutama terkait dengan bioaktivitas homeostatis, termasuk

regenerasi jaringan, proliferasi sel, dan kelangsungan hidup sel.³⁸ Namun, jalur ini juga diketahui memicu respons inflamasi dan kekebalan sel terhadap patogen. Secara keseluruhan, *TNFR1* sangat penting untuk menginduksi respons *TNF- α* sitotoksik dan proinflamasi, sementara *TNFR2* sebagian besar dapat memediasi aktivasi, migrasi, atau proliferasi sel.³⁹ Secara fisiologis, *TNF- α* merupakan komponen penting untuk respon imun yang normal. *TNF- α* dapat mengaktifkan sistem kekebalan untuk mengatur; namun, produksi *TNF- α* yang berlebihan dapat berbahaya dan menyebabkan penyakit.⁴⁰



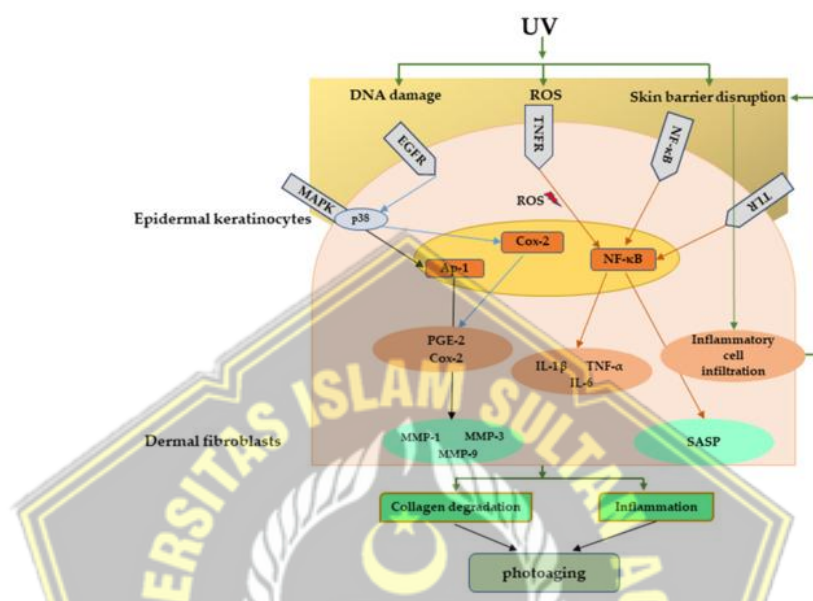
Gambar 2.2. Jalur pensinyalan *TNF- α* , *TNFR1* dan *TNFR2*²⁹

2.2.2. Peran TNF- α pada penurunan kolagen

Konsentrasi TNF- α meningkat selama degradasi kolagen. Di sisi lain, tingkat TNF- α yang rendah mewakili "inflamasi" yang lebih rendah. Penurunan kadar kolagen adalah suatu kondisi yang memungkinkan atau menyebabkan munculnya beberapa penyakit yang terkait kolagen. Paparan UVB pada kulit dapat menghasilkan peningkatan jumlah ROS, yang menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dan mekanisme pertahanan antioksidan, yang mengakibatkan stres oksidatif.⁴¹ Stres oksidatif ini dapat meningkatkan produksi ROS, dan dapat memulai peradangan dan aktivasi sitokin pro-inflamasi, seperti interleukin-2 (IL-2), IL-6, dan TNF- α , melibatkan beberapa jalur NF- κ B, *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf-2), dan *activator protein 1* (AP-1).^{42,43}

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

degradasi ECM. Gambar 2.2 menjelaskan jalur pensinyalan utama ekspresi molekul proinflamasi termasuk $\text{TNF-}\alpha$ yang terlibat dalam penurunan kolagen hingga photoaging yang diperantarai UV.^{44,45}



Gambar 2.3. Jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam *photoaging* yang dimediasi UV akibat aktivasi reseptor inflamasi⁴⁵

2.3. Kolagen

Definisi kolagen adalah polipeptida ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe kolagen, jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia.⁴⁶ Tubuh manusia terdapat sekitar 90% kolagen tipe 1. Kolagen tipe I ini ditemukan terutama di kulit, tendon, tulang dan ligamen. Serabut kolagen-I berperan penting dalam memberikan struktur dan kekuatan kulit, tulang, tendon, dan ligamen. Selain, kolagen tipe 1 juga terdapat tipe-tipe kolagen lainnya seperti kolagen tipe II, III, IV,

V, hingga tipe XII dan seterusnya yang memiliki peran spesifik dalam berbagai jaringan dan fungsi tubuh⁴⁷.

Kolagen merupakan serat utama pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein yang berfungsi untuk kekuatan mekanik dan penyangga kulit. Semakin bertambah umur maka struktur protein kulit dan komponen kulit lain akan berubah dan hal ini menyebabkan penuaan kulit. Perubahan jumlah kolagen merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Diperkirakan bahwa akan terjadi penurunan kolagen sekitar 1% pertahun perunit area kulit akan tetapi pada kulit yang terpapar sinar UVB dijumpai penurunan sampai 59% seperti yang ditemukan pada kulit yang mengalami *photodamage*.⁴⁵ Pada pasien dengan paparan sinar UVB kronis akan menurunkan jumlah kolagen-7 dan akan mengakibatkan perlekatan antara membrana basalis dengan papilla dermis menurun sehingga ikatan epidermis dan dermis menjadi lemah. Pada satu penelitian didapatkan bahwa kerutan kulit terbentuk akibat lemahnya ikatan antara dermis dan epidermis oleh karena degenerasi *anchoring fibril*. Hal ini ditambah adanya bukti adanya penurunan kolagen-7 pada dasar kerutan kulit di samping juga ditemukan penurunan kolagen-4 pada tempat yang sama⁴⁸.

2.4. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

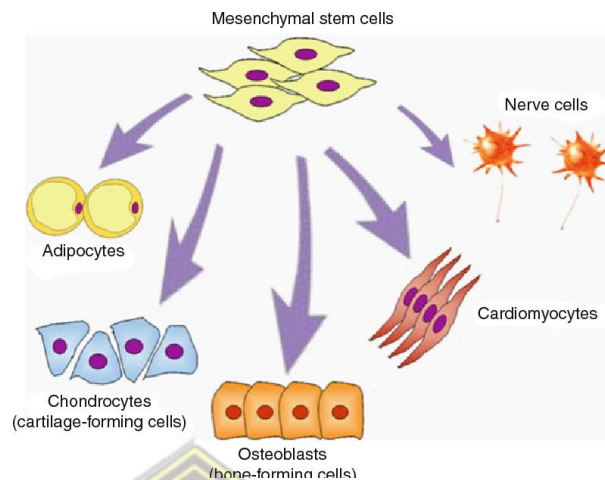
2.4.1. Definisi MSCs

Mesenchymal stem cell (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adiposit, dan neurosit. *Mesenchymal stem cell* dapat

diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, *bone marrow*, hingga *wharton jelly* dari tali pusat⁴⁹. Secara umum, *MSCs* diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan dan bentuk menyerupai sel *fibroblast* atau jarum. Secara *fenotype*, *MSCs* yang diisolasi dari tikus, dimana *MSCs* tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain *CD44* dan *CD29*, namun mengekspresikan marker spesifik *CD45* dan *CD31* dan bersifat *osteogenic*⁵⁰.

2.4.2. Karakteristik *MSCs*

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self-renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit⁴⁹. Selain itu, *MSCs* juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekspresikan beberapa *sitokin* baik pro atau pun anti inflamasi. *MSCs* diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang disebut *secretome*, biasanya diklasifikasikan sebagai *sitokin*, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, *growth factor* (*GF*), hormon, eksosom, mikrovesikel dan faktor anti-inflamasi. Hal ini menjadikan *MSCs* memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit^{51,52}.



Gambar 2.4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs⁵³

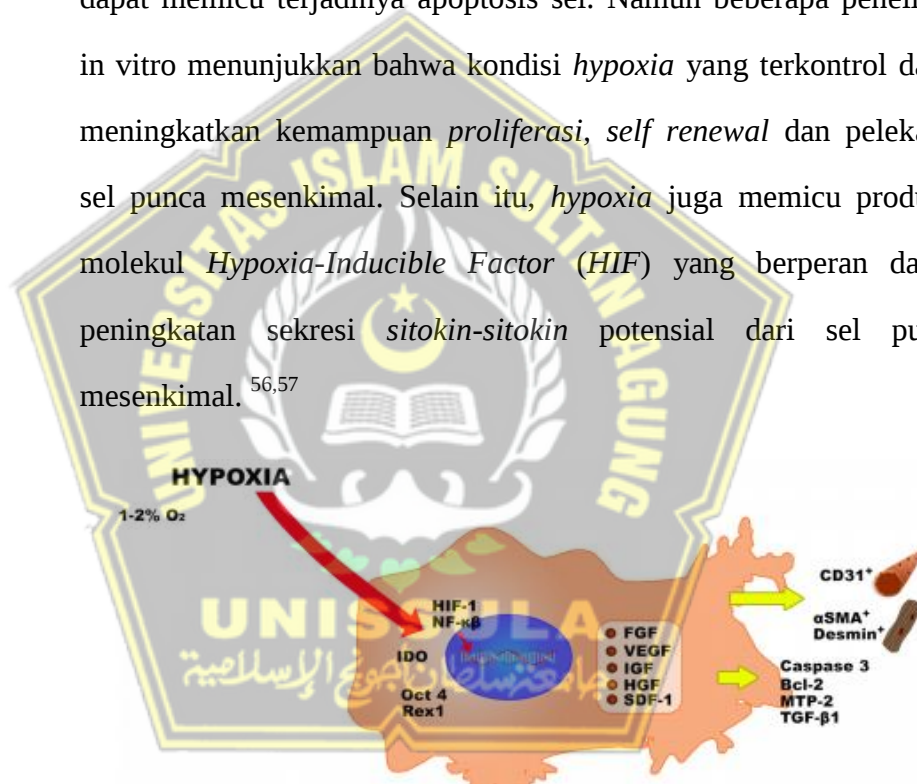
2.4.3. Peran MSCs

MSCs secara *in-vivo* berperan dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk berubah menjadi MSCs tipe 1 yang bersifat pro-inflamasi atau menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi. MSCs tipe 1 berperan dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Hal ini menyebabkan proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi selesai, MSCs akan berubah peran menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam

mengeksresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi.^{54,55}

2.4.4. Hipoksia

Definisi hipoksia adalah keadaan dimana suplai oksigen pada jaringan berada dibawah ambang normal. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun beberapa penelitian in vitro menunjukkan bahwa kondisi *hypoxia* yang terkontrol dapat meningkatkan kemampuan *proliferasi*, *self renewal* dan pelekatan sel punca mesenkimal. Selain itu, *hypoxia* juga memicu produksi molekul *Hypoxia-Inducible Factor (HIF)* yang berperan dalam peningkatan sekresi sitokin-sitokin potensial dari sel punca mesenkimal.^{56,57}



Gambar 2.5. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs⁵⁷

2.5. Pengaruh HMSCs terhadap Ekspresi CD68 dan Kadar TNF- α

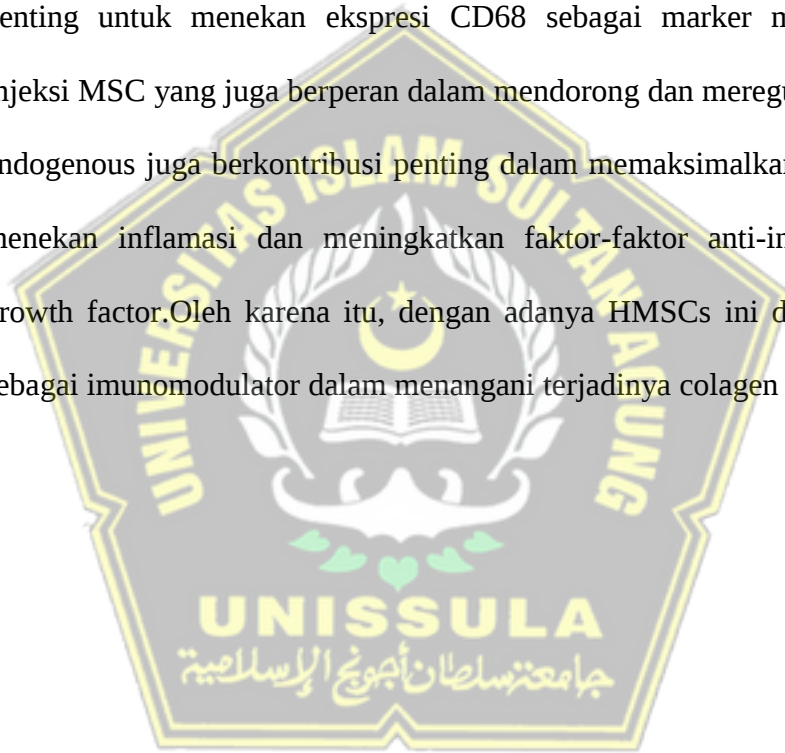
HMSCs dapat menginduksi sekresi mediator-mediator dan *growth factor* yang mendukung regenerasi melalui kemampuannya untuk mengatur respons sistem kekebalan tubuh melalui faktor imunomodulasinya seperti IL-10 dan TGF- β , yang dapat menghambat produksi TNF- α dari sel-sel

imun (makrofag dan sel T).⁵⁸ Disamping itu, molekul anti-inflamasi seperti Interleukin-1 Receptor antagonist (IL-1Ra) dan interleukin-4 (IL-4) yang terkandung dalam MSCs juga telah terbukti mampu dan dapat mengurangi inflamasi melalui penghambatan produksi TNF- α .⁵⁹

Paparan UVB menginduksi pembentuk ROS oleh mitokondria akibat stress oksidatif.⁶⁰ ROS mengaktifasi jalur NF- κ B disitoplasma melalui berbagai mekanisme. ROS mengaktifasi NF- κ B melalui fosforilasi IKK α sehingga mengakibatkan degradasi IKB α sehingga NF- κ B dapat masuk kedalam nucleus untuk mengaktifkan transkripsi.⁶¹ ROS juga dapat mempengaruhi sifat pengikatan DNA dari protein NF- κ B itu sendiri.⁶²

NF- κ B yang aktif akan mentranslokasi ke nucleus dan menginduksi transkripsi target seperti IL-6, IL-1 β , IL-8 dan TNF- α .⁶³ Peningkatan ekspresi sitokin inflamasi ini menginduksi degradasi kolagen melalui ekspresi MMP-3 dan menyebabkan terbentuknya *wrinkle*.⁶⁴ Sitokin IL-10 yang diinduksi HMSCs dapat mencegah secara langsung produksi ekspresi ROS.⁶⁵ IL-10 mengaktifasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentranslokasi kedalam nucleus untuk memicu ekspresi gen responsive STAT3, antara lain *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). Melalui sintesis SOCS3 de novo, IL-10 dapat menghambat ekspresi sejumlah gen proinflamasi termasuk gen sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ . SOCS3 juga menghambat aktivasi MAPK dan translokasi NF- κ B kedalam nucleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen proinflamasi.⁶⁶ Kandungan lain dari HMSCs adalah TGF- β yang terbukti

secara signifikan mengaktifasi fosforilasi SMAD2/3 untuk masuk ke nucleus dan menginduksi ekspresi sitokin anti-inflamasi.⁶⁷ Adanya ekspresi molekul-molekul anti inflamasi, seperti IL-10 dan TGF- β berperan penting dalam menekan aktivasi makrofag M1 proinflamasi, meningkatkan diferensiasi dan polarisasi makrofag M2 sebagai anti-inflamasi. MSC yang diberikan dapat mensekresikan eksosom dan faktor immunomodulator yang penting untuk menekan ekspresi CD68 sebagai marker makrofag M1. Injeksi MSC yang juga berperan dalam mendorong dan meregulasi stem cell endogenous juga berkontribusi penting dalam memaksimalkan terapi untuk menekan inflamasi dan meningkatkan faktor-faktor anti-inflamasi serta growth factor. Oleh karena itu, dengan adanya HMSCs ini dapat berperan sebagai immunomodulator dalam menangani terjadinya collagen loss.



BAB III

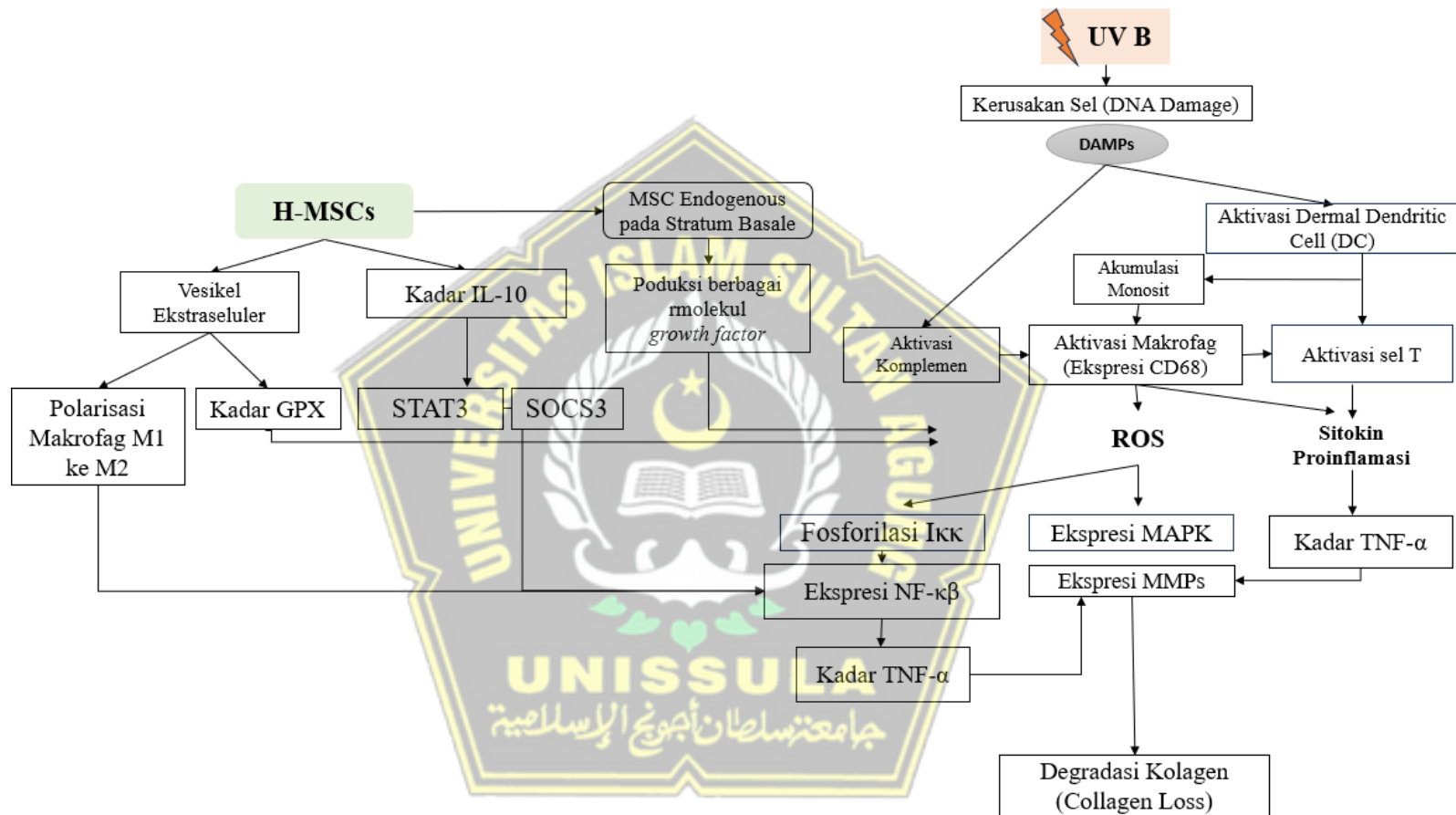
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan terhadap radiasi UVB dapat menginduksi penuaan kulit dini (*photoaging*) dan penurunan kadar kolagen dermal. Mekanisme molekuler yang terlibat dalam *photoaging* yang diinduksi UVB termasuk kerusakan DNA yang berakibat pada kerusakan sel, produksi ROS dan inflamasi. Kerusakan sel yang kemudian dikenali sebagai *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang terjadi memicu *recruitment* sel-sel dendritik yang berujung pada aktivasi sel monosit dan aktivasi komplemen yang mengarah pada aktivasi makrofag sebagai respon imun innate dan aktivasi sel T sebagai respon imun adaptif. Makrofag yang teraktivasi ditandai dengan adanya marker *CD68 positive* serta sel T yang teraktivasi ini akan menjalankan fungsinya untuk sekresi sitokin pro inflamasi. Makrofag yang teraktivasi juga berkontribusi dalam meningkatkan ROS. ROS yang terakumulasi akibat adanya paparan UV B ini menjadi faktor utama dalam memicu aktivasi berbagai jalur persinyalan yang mengarah pada semakin meningkatnya inflamasi yang berlebihan melalui jalur pensinyalan MAPK dan aktivasi faktor transkripsi NF- κ B. Jalur persinyalan MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) memainkan peran penting dalam regulasi ekspresi MMP (*Matrix Metalloproteinases*). MMP adalah enzim proteolitik yang terlibat dalam degradasi komponen matriks ekstraseluler (ECM) sehingga berujung pada *photoaging* dan *collagen loss*.

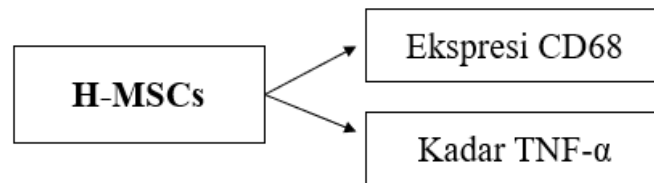
Selain itu, adanya sinyal stress oksidatif akibat adanya level ROS yang tinggi dan sinyal inflamasi dari ekspresi sitokin TNF- α akan mengaktifkan kompleks kinase (fosforilasi I κ B). Jalur persinyalan NF- κ B yang secara terus menerus aktif ini kemudian akan berdampak pada semakin tingginya kadar TNF- α yang berujung pada degradasi kolagen (Gambar 3.1).

Pemberian injeksi MSC menjadi terapi pengobatan regeneratif yang dapat meningkatkan dan meregulasi populasi stem cell endogenous dan/atau mengisi kembali kumpulan sel untuk mencapai homeostasis dan regenerasi sel maupun jaringan. MSCs saat di pre-kondisi hipoksia mampu meningkatkan sekresi vesikel ekstraseluler atau eksosom yang mengandung berbagai enzim antioksidan, termasuk GPX. GPX mampu secara langsung menetralkan ROS menjadi H₂O. Disamping itu, HMSCs meningkatkan kemampuan anti-inflamasinya dengan mengekspresikan kadar IL-10 dalam jumlah yang tinggi. IL-10 berperan penting dalam menurunkan inflamasi dan mencegah degradasi kolagen via *Suppressor of Cytokine Signalling-3* (SOCS3). Hal ini dapat terjadi karena IL-10 dapat mengaktifasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentraslokasi kedalam nucleus untuk memicu ekspresi gen responsive STAT3, yaitu *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). Mekanisme tersebut memicu ekspresi molekul-molekul anti inflamasi yang berperan penting dalam meregulasi ekspresi makrofag dan kadar TNF- α . Sehingga dengan adanya IL-10 dan GPX berujung pada mekanisme penghambatan *photoaging* dan peningkatan persentase kolagen pada kulit.



Gambar 3.1. Kerangka Teori Penelitian

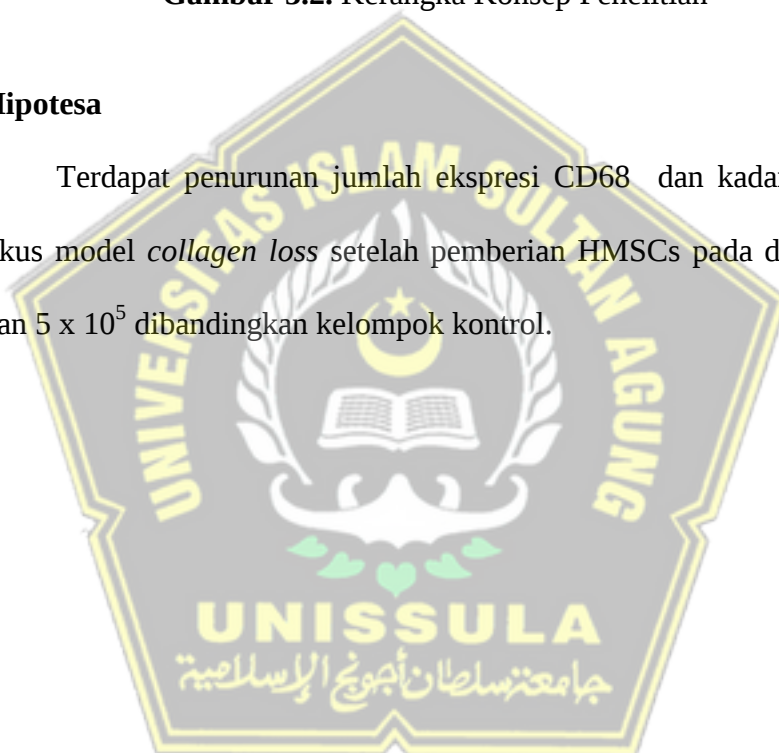
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep Penelitian

3.3. Hipotesa

Terdapat penurunan jumlah ekspresi CD68 dan kadar TNF- α pada tikus model *collagen loss* setelah pemberian HMSCs pada dosis 2.5×10^5 dan 5×10^5 dibandingkan kelompok kontrol.

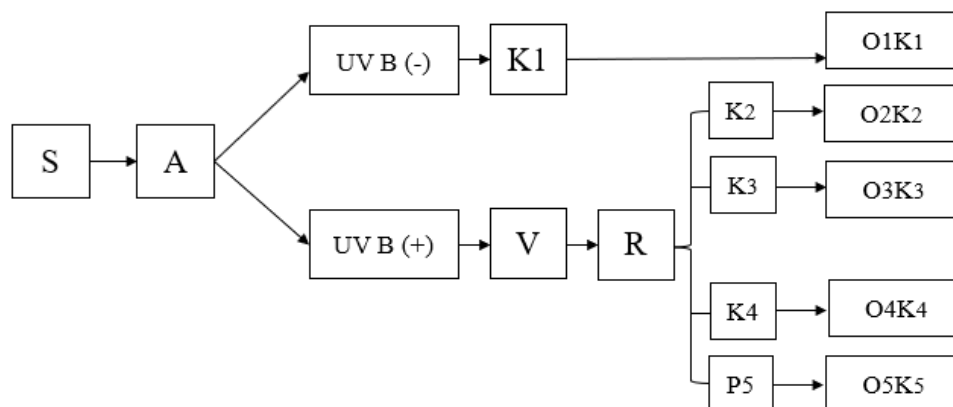


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental menggunakan design penelitian berupa *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan tiap perlakuan. Subjek penelitian adalah tikus jantan galur *Wistar (Rattus norvegicus)* dengan BB $\pm$ 200-250 g. Kelompok yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari 5 kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok tikus sehat (K1) yaitu kelompok tikus sehat tanpa penyinaran UV-B. Kelompok kedua adalah kelompok kontrol negatif (K2) yaitu kelompok tikus yang dimodelkan *collagen loss* dengan penyinaran UV B dengan pemberian 200 μ L NaCl. Kelompok ketiga adalah kelompok kontrol positif (K3) yaitu kelompok tikus yang dimodelkan *collagen loss* dengan penyinaran UV B dengan diberi 200 μ L *hyaluronic acid* (HA). Kelompok keempat adalah kelompok perlakuan 1 (K4) yaitu kelompok tikus yang dimodelkan *collagen loss* dengan diberi HMSCs dosis 2.5×10^5 dalam 200 μ L NaCl. Kelompok kelima adalah kelompok perlakuan 2 (K5) yaitu kelompok tikus yang dimodelkan *collagen loss* dengan diberi HMSCs dosis 5×10^5 dalam 200 μ L NaCl.



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

- S : Sampel
 A : Aklimasi
 V : Validasi
 R : Randomisasi menjadi 4 kelompok
 K1 : Sehat
 K2 : Kontrol negatif
 K3 : Kontrol positif
 K4 : Perlakuan 1
 K5 : Perlakuan 2

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

a. Variabel bebas

HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel secara subkutan

b. Variabel Terikat

Variabel terikat: Ekspresi CD68 dan Kadar TNF- α

c. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah sinar UVB.

d. Variabel Terkendali

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

4.2.2. Definisi Operasional

1. Sinar Ultraviolet (UV)

- Sinar ultraviolet (UV) yang digunakan adalah sinar UV B.
- Paparan sinar UV B yang diberikan dengan panjang gelombang 160 mJ/cm² dengan jarak 20 cm dimana panjang gelombang tersebut mampu menyebabkan kerusakan biologis termasuk degradasi kolagen
- Penyinaran sinar UV B dilakukan lima hari seminggu selama dua minggu
- □ Paparannya adalah paparan kronis karena dipapar selama 2 minggu
- Pemberian penyinaran sinar UV B ini dipilih karena radiasi UVB memiliki tingkat energi yang lebih tinggi dibandingkan UVA, sehingga lebih efektif menyebabkan kerusakan biologis, termasuk degradasi kolagen.⁶⁸
- UVB dapat menembus epidermis dan menjadi model yang *well-established* untuk studi mengenai efek radiasi UV pada

kulit, termasuk degradasi kolagen dan penuaan kulit. UV B juga terbukti menyebabkan kulit erithema, kerusakan DNA hingga menyebabkan kanker kulit.⁶⁸

2. HMSCs

- HMSCs yang digunakan adalah MSCs yang diberlakukan prekondisi hipoksia 5% selama 24 jam. Hal ini dilakukan karena prekondisi hipoksia mampu meningkatkan ekspresi sitokin anti-inflamasi dan *growth factor* pada MSCs yang dibutuhkan untuk proses regenerasi akibat aging, *collagen loss* dan *skin wrinkle*.
- HMSCs yang digunakan yang telah di validasi mengekspresikan CD90⁺ dan CD44⁺, serta tidak mengekspresikan CD45⁻ dan CD31⁻. Validasi dilakukan dengan menggunakan instrumen flowcytometry dengan satuan persen.
- Dosis HMSCs yang digunakan adalah 2.5×10^5 sel (K4) dalam 200 μ L NaCl dan 5×10^5 sel (K5) dalam 200 μ L NaCl secara subkutan. Pemilihan dosis ini mengacu pada hasil studi sebelumnya yang menyatakan bahwa frekuensi dosis MSCs yang digunakan dalam *clinical trials* ada pada interval $0,5-12 \times 10^6$ sel/kg *single dose*.⁶⁹ Unit : Sel per mikroliter (sel/ μ L), Skala : rasio.

3. Ekspresi CD68

Ekspresi CD68 adalah jumlah relatif CD68 yang diproduksi jaringan kulit pada sampel penelitian. Ekspresi CD68 dianalisis menggunakan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR).

Unit : mutiple (x)

Skala : Rasio

4. Kadar TNF- α

Kadar TNF- α adalah jumlah absolut protein TNF- α yang terkandung dalam jaringan kulit pada sampel penelitian. Kadar TNF- α dianalisis menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Unit : Picogram per mikroliter (pg/ μ L), Skala : Rasio.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

- Subyek penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari SCCR *Animal Model Research Center*, Semarang.
- Subjek penelitian dipapar sinar UV-B 160 mJ/cm² selama 8 menit dengan jarak 20 cm selama 5 kali seminggu selama 2 minggu hingga densitas kolagen pada kulit menurun.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

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

- a. Usia 2-3 bulan;
- b. Tikus yang mengalami *collagen loss* akibat paparan UV-B.
- c. Bobot badan 200 - 250 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

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

- a. Memiliki kelainan anatomis.
- b. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
- c. Tikus yang sakit sebelum masa penelitian
- d. Tikus yang tidak mengalami *collagen loss*

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Kriteria *drop out* sampel penelitian adalah tikus jantan putih galur *Wistar* yang mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel

- Pengambilan sampel penelitian ini dilakukan menggunakan teknik *Randomized Sampling*.
- Penelitian diawali dengan aklimasi 25 ekor Tikus putih jantan galur *Wistar* selama 7 hari

- Tikus putih jantan galur *Wistar* dirandomisasi kedalam 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus sehat atau normal yang tidak diberi perlakuan (K1), kelompok tikus yang dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi 200 μL NaCl (K2), kelompok tikus yang dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi perlakuan 200 μL HA (K3), kelompok tikus yang dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi perlakuan HMSCs dosis 2.5×10^5 dalam 200 μL NaCl (K4), dan kelompok tikus yang dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi perlakuan HMSCs dosis 5×10^5 dalam 200 μL NaCl (K5).
- Pengambilan sampel jaringan kulit untuk validasi dan observasi dilakukan satu kali pada satu tikus di hari ke 15 setelah paparan UVB.
- Validasi dilakukan dengan *staining* jaringan menggunakan *Masson Trichome* di hari ke 15 setelah paparan UVB.
- Setelah di validasi, tikus diberikan injeksi sesuai kelompok perlakuan dan diberikan pakan standar sampai hari ke 21
- Setelah pemberian injeksi HMSCs selama satu minggu, pada hari ke 22 dilakukan terminasi.

- Jaringan kulit diisolasi dan disimpan dalam buffer formalin 10% dan suhu normal untuk pemeriksaan *masson trichome staining*, suhu -80°C untuk sampel pemeriksaan ELISA dan suhu 4°C untuk sampel yang diberi RNA later untuk pemeriksaan qRT-PCR.

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel minimal mengikuti kriteria *federer* yaitu sebanyak 5 ekor per kelompok, sehingga jumlah sampel minimal pada penelitian ini adalah 25 ekor tikus wistar. Penghitungan besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini dilakukan menggunakan rumus sampel eksperimental *Federer* sebagai berikut:

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

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 4.75 \rightarrow 5$$

keterangan :

t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah sampel setiap perlakuan

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *Micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip)*, *pippete filler*, *conical tube* 15ml dan 50 ml, *cryotube* 1 ml, *haemocytometer*, *inverted*

microscope, CO₂ cylinder, N₂ cylinder scissor, pinset, scalpel, bistouri, spuit berbagai ukuran, thermostirrer, sentrifuse dingin (Thermo, USA), minor set, pot jaringan, gelas beker, flask T75 (Corning, Life Sciences, USA), aluminium foil, disk, well plate, 96 well plate, hot plate, hotplate stirrer, disposable pipet, heparin tube (BD Vacutainer, Oxford, UK), conical tube, cryo tube, haemocytometer, cell counter, biosafety cabinet Class 2, CO₂ incubator (Thermo, USA), hypoxia chamber, tempat penyimpanan sampel (refrigerator) dengan temperatur -20⁰C dan -80⁰C, mikroskop inverted (Carl Zeiss Inc, Göttingen, Germany), BD FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), opitlab, decloaking chamber (Biogear), Illumina's Eco Real-Time PCR System, spinner, fluorometer Quantus (Promega, Madison, WI, USA), slide Poly-L-Lysine Coated (Biogear).

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk analisis dan pembuatan model diantaranya adalah ELISA kit TNF- α (eLabscience, USA), Starr Trek Universal HRP Detection Kit (STUHRP700Hkit, Biocare Medical), Masson's trichrome stain Kit (Bio-Optica Milano S.p.A), FavorPrep Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Ping-Tung, Taiwan), cDNA sintesis KIT (Sigma, St. Louis, MO, USA), primer forward dan reverse CD68 dan β -actin.

Bahan untuk isolasi MSCs diantaranya adalah umbilical cord tikus, medium alfa MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), tripsin (Sigma, St. Louis, MO, USA), fungizon 1%, tripan blue (Sigma, St. Louis, MO, USA), NaCl 0,9%, PBS (Phospat Buffer Salin) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO, USA) alkohol 70%, 80%, 95% dan 100% (Merck-Millipore, Australia), streptomisin-penisilin 1% (penstrep) dan xylol (Merck-Millipore, Australia). Bahan untuk validasi MSCs adalah Anti-Rat CD90 PerCP (eBioscience, San Diego CA), Anti-Rat CD29 Alexa Fluor 647 (eBioscience, San Diego CA), Anti-Rat CD31 PE (eBioscience, San Diego CA), dan Anti-Rat CD45 FITC (eBioscience, San Diego CA), Media Basal Diferensiasi Osteogenik MesenCult™ (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), Media Basal Diferensiasi Adipogenik MesenCult™ (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), Oil Red O (Sigma, St. Louis, MO, USA) dan Alizarin Red (Sigma, St. Louis, MO, USA).

4.5. Prosedur Pelaksanaan Penelitian

4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian akan diajukan di Komite Etik Penelitian Universitas Islam Sultan Agung, Semarang.

4.5.2. Induksi Collagen Loss

- Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dilakukan pemotongan rambut pada bagian dorsal hingga bersih.
- Tikus yang telah dibersihkan bagian dorsalnya dimasukkan ke dalam UV chamber.
- Tikus kemudian disinari dengan dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu untuk menginduksi *collagen loss*.
- Validasi terbentuknya hewan model dilakukan dengan staining *Masson trichrome*

4.5.3. Isolasi MSCs dari *Umbilical Cord* (UC)

- Isolasi MSCs dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas tinggi
- Tikus hamil dengan usia 21 hari dianestesi dengan menggunakan anestesi dosis lethal dengan 10 mL cocktail digunakan Ketamine 50 mg/kgBB, Xylazine 10 mg/kgBB dan Acepromazine 2 mg/kgBB yang diisuntikkan secara intramuscular
- Kemudian dilakukan pemeriksaan reflek akral, frekuensi nafas dan jantung, apabila tidak ada reflek, maka tikus dipastikan sudah tidak bernyawa.

- Setelah dipastikan tikus tidak bernyawa kemudian dicukur bagian abdominal, kemudian dilakukan laporotomi dan diambil janin yang ada dalam perut tikus
- Janin yang diperoleh dimasukkan dalam medium transfer dan selanjutnya dibawa kedalam laboratorium untuk dilakukan isolasi, semua proses harus dilakukan secara steril.
- *Umbilical cord* dikumpulkan dan diletakkan dalam cawan petri yang mengandung NaCl 0,9%.
- Dengan menggunakan pinset, letakkan *umbilical cord* ke petri dish, cuci sampai bersih dengan PBS (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)
- Jaringan tersebut dipotong kecil-kecil (3-5cm) menggunakan bisturi steril, pembuluh darah pada potongan *umbilical cord* dibuang untuk mengurangi kontaminasi
- Kemudian potongan *umbilical cord* atau eksplan dipindahkan ke cawan petri yang bersih.
- Tiap potongan *umbilical cord* dihancurkan dengan gunting mata tajam atau bisturi menjadi potongan yang lebih kecil (1 mm),
- Jaringan yang telah terpotong kecil-kecil, diletakkan pada flask T75 dengan susunan titik-titik yang tersebar rata pada flask T75 (Corning, Life Sciences, USA), diamkan selama 3 menit hingga eksplan melekat.

- Kemudian ditambahkan medium komplit yang terdiri dari DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), fungizon, penstrep (*antibiotic*), dan 10% *Fetal bovine serum* (FBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan kurang lebih 3 mL.
- Selanjutnya, diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37⁰ C dan 5% CO₂.
- Pengamatan sel dilakukan setiap 24 jam untuk melihat ada sel yang keluar dari penanaman menggunakan *microscope inverted*.
- Medium diganti setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium menggunakan *multipipette* diganti dengan *fresh medium* komplit sebanyak yang dibuang.
- Setelah sel muncul dari *explan*, tambahkan medium komplit menjadi 5 mL.
- Setelah 24-72 jam dari munculnya sel *explan*, sel yang mengapung di pindahkan ke cawan petri yang baru dengan cara ambil semua medium dan masukkan ke *conical tube* 15ml.
- Kemudian lakukan sentrifugasi 1500 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan resuspensi pelet dengan medium komplit.
- Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%.

4.5.4. Pemanenan dan Penghitungan MSCs

- Proses pemanenan sel dilakukan menggunakan tripsin 1 ml (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) untuk melepas sel-sel yang

bersifat adherent dengan inkubasi selama 3 menit pada suhu 37°C di dalam inkubator

- Kemudian diberi medium inaktivasi.
- Sel diamati dengan mikroskop inverted untuk memastikan sel sudah terlepas, apabila sudah lepas sel diambil menggunakan *micropipette* untuk dipindahkan kedalam *conicle*.
- Penghitungan sel dilakukan dengan mengambil 10 µl sel dan dimasukan ke cryotube menggunakan pipet, kemudian ditambahkan 10 µl *trypan blue* (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)
- Selanjutnya diambil 10µL dan masukkan ke bilik hitung (*hemocytometer*) yg sudah ditutup dengan *deck Glass*, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop inverted (Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany) pada 4 bilik hitung. Hitung jumlah sel dengan menggunakan rumus berikut:

$$\frac{\sum n}{4} \times 4^2 \times \text{Pengenceran}$$

4.5.5. Validasi MSCs *Imunophenotyping* dengan menggunakan *Flow Cytometry*

- Ketika sel sudah mencapai konfluen 80% dan sel dipanen dan diambil sebagai sampel validasi MSCs

- Identifikasi *immunophenotype* MSCs tikus dilakukan dengan memeriksa ekspresi CD29, CD31, CD 45 dan CD90 menggunakan metode pemeriksaan *flowcytometry*.
- Sel dilepaskan dari flask menggunakan tripsin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).
- Selanjutnya, sel dengan konsentrasi 1×10^7 sel /mL dicuci dan diresuspensi menggunakan BD Pharmingen™ Stain Buffer (cat. No. 554656) atau PBS tripsin 1 ml (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).
- Sampel diambil 100 μ l ke dalam masing-masing microtube sesuai total pewarnaan pada tabel 4.1 untuk divortex
- Masing-masing tube ditambahkan reagen antibodi sesuai dengan tabel 4.1
- Sel diinkubasi selama 30 menit suhu ruang, dalam ruang gelap dan dicuci sebanyak 2 kali dengan stain buffer (PBS) dan diresuspensi dengan 300-500 μ l stain bufer (PBS) atau 1 kali washing buffer (FBS).
- Tabung 1-5 sebagai kontrol untuk set up cytometry (sebagai kompensasi) pada pembacaan analisis *flow cytometry*.

Tabel 4. 1. Reagen yang digunakan dalam analisis *flow cytometry*
(Bühning *et al.*, 2007)⁷⁰

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC mouse anti-human CD29	5µl
2	PE mouse anti-human CD44	5µl
3	PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD45	5µl
4	APC Mouse anti-human CD31	5µl
5	Kosong	-
6	HMSCs <i>positive isotype control cocktail</i>	20µl
	HMSCs <i>negative isotype control cocktail</i>	20µl
7	HMSCs <i>positive cocktail</i>	20µl
	PE HMSCs <i>negative cocktail</i>	20µl

4.5.6. Induksi Hipoksia MSCs

- MSCs yang telah dikultur dicek apabila konfluensinya telah mencapai 80% ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
- MSCs di dalam flask kemudian dimasukkan ke dalam hipoksia chamber.
- Gas N₂ disalurkan melalui katup inlet dan O₂ meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi O₂ di dalam chamber.
- N₂ ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% O₂.
- Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- MSCs kemudian dipanen dan dipindahkan ke spuit 1 cc dengan media pembawa NaCl 200 µL.

4.5.7. Perlakuan pada Hewan Coba

- Pemberian perlakuan pada hewan coba dilakukan dengan cara tikus di injeksi HMSCs dosis 2.5 x 10⁵ dan 5 x 10⁵ sel masing-masing dalam 200 µL NaCl secara subkutan pada hari ke 15 setelah induksi UVB.
- Tikus kemudian diamati secara makroskopis pada hari ke 21 dan didokumentasi.
- Tikus kemudian dilakukan terminasi setelah pengamatan untuk pemeriksaan parameter uji.

4.5.8. Uji Ekspresi CD68

1. Isolasi dan Analisis Konsentrasi dan Kemurnian RNA Sampel Kulit

- Sampel kulit sebanyak 100 mg diambil dari RNA later dipotong kecil dan halus, kemudian dimasukkan ke dalam tabung 5 mL.
- Sampel kulit diberi Triagent 1 mL dan dilakukan proses ultrasonikator selama 1 menit. Sampel kemudian diinkubasi di suhu ruang selama 5 menit.
- Kloroform sebanyak 0.2 mL dimasukkan ke sampel, kemudian sampel ditutup dan dihomogenisasi menggunakan vortex dengan kecepatan tinggi selama 10 detik.
- Sampel tersebut selanjutnya diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang dan kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan

12000 x g selama 5 menit pada suhu 4°C.

- Sentrifugasi tersebut memisahkan larutan menjadi 3 layer: 1) *lower red organic phase* (mengandung protein); 2) *interphase* (mengandung DNA); dan 3) *upper aqueous phase* (containing RNA).
- Lapisan paling atas kemudian dipindahkan ke tube baru. Hasil larutan RNA kemudian dianalisis kemurnian dan konsentrasinya dengan Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer menggunakan μ Drop plates.
- Konsentrasi RNA yang dibutuhkan adalah 0.0005 – 0.25 μ g/ μ L dengan nilai kemurnian A260/280 pada rasio 1.8-2.0 sebagai syarat RNA terbebas dari kontaminan berupa DNA dan protein.

2. Sintesis cDNA

- Sample mix dibuat dengan melarutkan 2 μ L RNA *template*, 1 μ L dNTP mix, 1 μ L primer oligo(dT) dan 6 μ L *nuclease free water* dalam *thermal cycler tube*.
- Sampel mix kemudian diresuspensi dan diinkubasi dalam *thermal cycler* pada suhu 70°C selama 10 menit.
- Tube selanjutnya diambil dan ditambahkan reagen mix yang terdiri dari 2 μ L 10x *buffer* for eAMV-RT, 1 μ L *enhanced avian RT*, 1 μ L *RNAse inhibitor* dan 6 μ L *nuclease free water*.

- Tube berisi sampel dan reagen mix kemudian dimasukkan kembali dalam *thermal cycler* dan diinkubasi dengan suhu 45°C selama 30 menit.
- Tube sampel kemudian dikeluarkan dan sampel dapat disimpan di suhu -20°C selama 1 bulan untuk proses analisis selanjutnya.

3. Analisis qRT-PCR

- Ekspresi mRNA dari CD68 dianalisis menggunakan qRT-PCR.
- Master mix untuk qRT-PCR dibuat dengan melarutkan 3 µl sampel cDNA, primer CD68 forward (5'-GCCTTCCTTCCTGGGTATG-3') dan reverse (5'-AGGAGCCAGGGCAGTAATC-3') serta primer *housekeeping* GAPDH forward (GCGACAGTCAAGGCTGAGA ATG) dan reverse (TCTCGCTCCTGGAAGATGGTGA) masing-masing 1 µL, SYBR Faser master mix universal sebanyak 10 µL dan *nuclease free water* 6 µL.
- Master mix kemudian dibaca menggunakan illumina eco RT-PCR dengan program amplifikasi 40 siklus yaitu: 1) denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, 2) denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit dan 3) annealing 60°C selama 1 menit.

- Data peningkatan ekspresi gen dianalisis dalam ratio peningkatan gen target terhadap housekeeping gen menggunakan software EcoStudy.

4.5.9. Uji Kadar TNF- α

- Jaringan kulit sampel tikus dikumpulkan dan dipotong kecil menggunakan pinset.
- Jaringan kulit sebanyak 5 mg dimasukan dalam mikrotube dan 300 μ L *protein extraction buffer* dicampurkan dan kemudian dihomogenisasi menggunakan ultrasonikator.
- Protein diisolasi dan dianalisis kadar TNF- α menggunakan ELISA sesuai protokol (Elabscience, TX, USA).
- Larutan standar dibuat dengan melakukan metode pengenceran sesuai seri konsentrasi yang ditetapkan protokol.
- Medium kultur dan larutan standar sesuai seri konsentrasi kemudian dimasukan ke dalam *well plate* 96.
- ELISA yang mengandung antibody dan diinkubasi selama 1 jam.
- Sampel dan antibody primer dibuang kemudian ditambahkan pada masing-masing sampel dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
- Sampel kemudian dicuci tiga kali menggunakan PBS.
- HRP *Conjugate* kemudian ditambahkan pada masing-masing sampel kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan ruang gelap.

- Sampel kemudian dicuci lima kali menggunakan PBS.
- Reagen substrat kemudian ditambahkan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C pada ruang gelap.
- *Stop solution* kemudian ditambahkan dan sampel dianalisis menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm (Qiao *et al.* 2020).

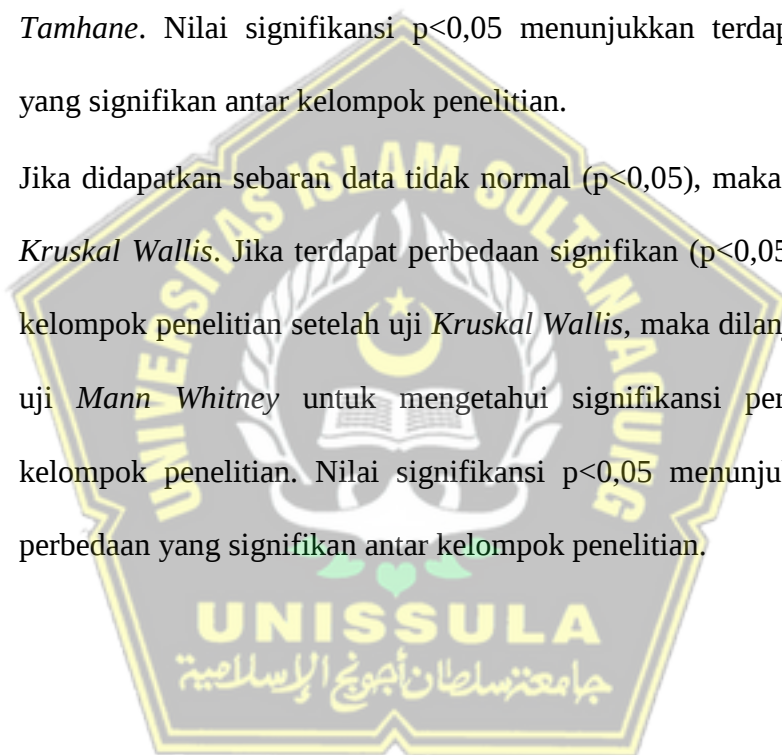
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Integrated Laboratory of SCCR Indonesia, Semarang pada bulan Oktober hingga November 2024.

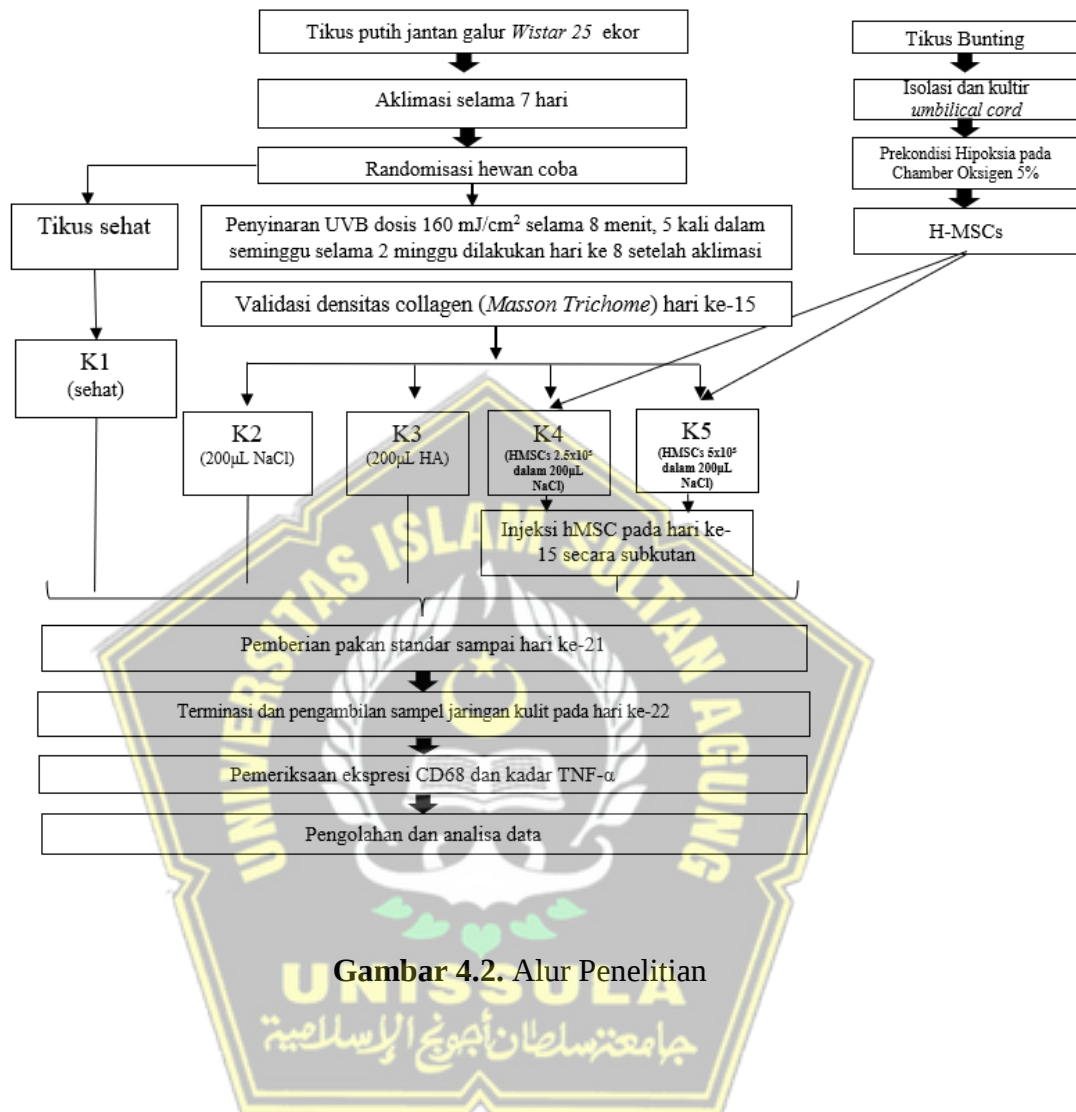
4.7. Analisis Data

- Hasil data penelitian yang telah dikumpulkan dilanjutkan dengan analisis statistik menggunakan software SPSS v26.0 untuk mengetahui signifikansi antar kelompok penelitian.
- Analisis normalitas dan variasi data dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*.
- Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian.

- Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.
- Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ($p > 0,05$) dan tidak homogen ($p < 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way ANOVA*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane*. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.
- Jika didapatkan sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Oktober– November 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Semarang. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian HMSCs terhadap ekspresi makrofag M1 (CD68) dan kadar TNF- α pada tikus model *collagen loss* dipapar sinar UV-B. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram. Tikus dipapar sinar UV-B 160 mJ/cm² selama 8 menit dengan jarak 20 cm selama 5 kali seminggu selama 2 minggu hingga densitas kolagen pada kulit menurun. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus dan tidak ada yang eksklusi atau drop out selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok dengan 1 kelompok sehat, 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif, dan 2 kelompok perlakuan. Kelompok pertama adalah kelompok tikus sehat (K1) yaitu kelompok tikus sehat tanpa penyinaran UV-B. Kelompok kedua adalah kelompok kontrol negatif (K2) yaitu kelompok tikus yang dimodelkan *collagen loss* dengan penyinaran UV B dengan pemberian 200 μ L NaCl. Kelompok ketiga adalah kelompok kontrol positif (K3) yaitu kelompok tikus yang dimodelkan *collagen loss* dengan penyinaran UV B dengan diberi 200 μ L *hyaluronic acid* (HA). Kelompok keempat adalah kelompok perlakuan 1 (K4) yaitu kelompok tikus yang dimodelkan *collagen loss* dengan diberi HMSCs dosis 2.5×10^5 dalam 200 μ L NaCl. Kelompok kelima adalah kelompok perlakuan 2 (K5) yaitu kelompok tikus yang dimodelkan *collagen loss* dengan diberi HMSCs dosis 5×10^5 dalam 200

$\mu\text{L NaCl}$.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Validasi Hewan Coba yang Diberi Paparan Sinar UV-B

Penyinaran UV-B dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Semarang, dengan panjang gelombang UV-B 302 nm, 160 mJ/cm^2 selama 8 menit dengan jarak 20 cm selama 5 kali seminggu selama 2 minggu hingga densitas kolagen pada kulit menurun pada tikus kelompok kontrol negatif, kelompok positif, kelompok perlakuan 1 & kelompok perlakuan 2 selanjutnya dilakukan uji validasi *Masson Trichome* pada hari ke-15 dengan pengamatan fisik dan mikroskopis didapatkan hasil seperti gambar 5.1.



Gambar 5.1. Validasi Collagen Loss secara makroskopis dan mikroskopis dengan pewarnaan Masson Trichrome. Tikus sehat tidak terlihat kerutan (A), Tikus yang disinari UVB tanpa perlakuan terlihat banyak kerutan (B). Dominasi warna biru menunjukkan banyaknya kolagen di tikus sehat (C), menurunnya dominasi warna biru menunjukkan penurunan densitas kolagen di tikus yang terpapar UVB tanpa perlakuan (D).

Penelitian ini menghasilkan gambaran fisik dari kedua kelompok sampel hewan coba yang dapat memberikan informasi mengenai kondisi struktural kulit. Kelompok tikus sehat menunjukkan tidak adanya kerutan atau lipatan dan menunjukkan tekstur yang halus dan elastis (Gambar 5.1-A), sementara pada kelompok yang diberi penyinaran UV-B menunjukkan permukaan kulit yang tidak rata, terbentuk kerutan atau lipatan dan tekstur kulit terasa lebih kaku dan kasar bila disentuh (Gambar 5.1-B). Hal ini mengindikasikan penyinaran UV-B yang diberikan berhasil memberikan perubahan elastisitas kulit akibat penurunan serat kolagen dan serat elastin yang rusak sebagai hewan coba model *collagen loss*.

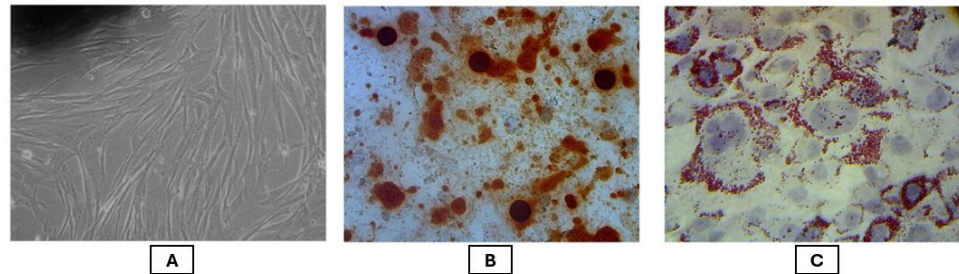
Validasi hewan coba model *collagen loss* ini juga di lakukan melalui pengamatan struktur jaringan dengan teknik staining *masson trichrome*. Gambaran histologi pada kelompok tikus yang tidak dipapar UV-B terdiri dari epidermis, dermis, dan hipodermis. Lapisan paling luar adalah epidermis dengan lapisan tipis keratin terhampar di atasnya. Dibawah epidermis terdapat dermis yang mengandung jaringan ikat dengan kolagen dan jaringan elastis yang padat, serat kolagen ditunjukkan pada gambar yang berwarna biru pada Gambar 5.1-C, sementara warna merah pada gambar tersebut menunjukkan bagian keratin, sitoplasma dan jaringan otot.⁷¹ Adapun histologi kulit pada kelompok yang dipapar UV-B menunjukkan

denaturasi serat kolagen yang ditunjukkan oleh dominasi warna merah pada bagian dermis dan secara kasar terlihat perbedaan jaringan ikat dan kolagen pada kelompok yang dipapar UV-B lebih longgar. Paparan UV-B dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast sehingga tidak adanya keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen.

5.1.2. Morfologi dan Validasi Uji Diferensiasi *Mesenchymal Stem Cell* (MSCs)

Proses isolasi MSCs dilakukan di *Laboratorium Stem Cell and Cancer Research*, Semarang, menggunakan teknik kultur eksplan dari tali pusat tikus bunting dengan tingkat sterilisasi tinggi dalam *biosafety cabinet class II*. Selanjutnya, eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂, dilakukan penggantian medium setiap 3 hari sekali hingga sel mencapai konfluensi 80%. Populasi yang digunakan adalah MSCs passage 7 dengan karakteristik morfologi berupa *spindle-like cell* yang melekat pada dasar flask seperti Gambar 5.2-A. Kemampuan osteogenic dan adipogenik MSCs juga merupakan salah satu metode validasi MSCs. MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit yang diindikasikan oleh endapan kalsium berupa pewarnaan merah dengan menggunakan pewarnaan Alizarin red dye (Gambar 5.2-B). MSCs juga mampu berdiferensiasi menjadi adiposit yang diindikasikan akumulasi lemak yang berwarna coklat dengan menggunakan pewarnaan *oil red o dye*

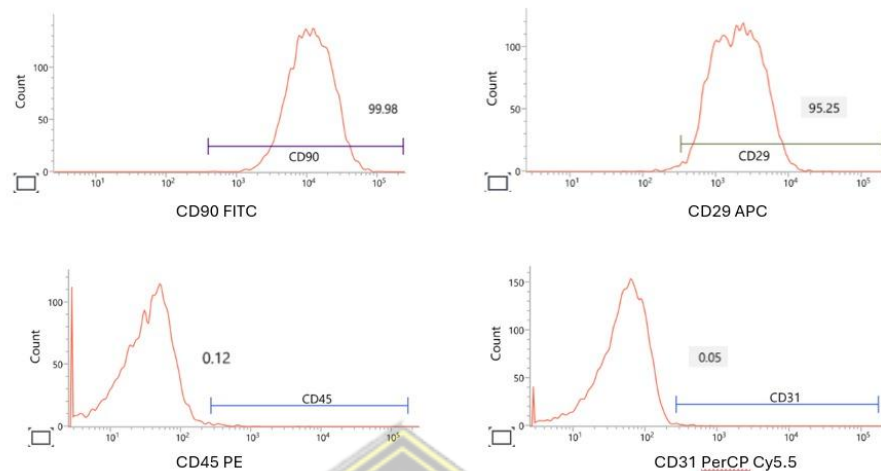
(Gambar 5.2-C).



Gambar 5.2. Gambaran Mikroskopik Morfologi MSCs konfluen 80% berbentuk spindle-like pada perbesaran 40x (A) dan hasil uji diferensiasi MSCs dengan medium kultur osteogenik (B) dan adipogenik (C) dengan perbesaran 400x.

5.1.3. *Immunophenotyping Mesenchymal Stem Cell (MSCs)*

Hasil isolasi sel MSCs divalidasi dengan *immunophenotyping* menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan MSCs mampu mengekspresikan *surface marker* penanda MSCs. Penelitian ini menunjukkan MSCs yang digunakan memiliki ekspresi positif CD90 (99,98%), CD29 (95.25%) dan memiliki ekspresi negatif CD45 (0,12%) dan CD31 (0,05%) (Gambar 5.3). Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa salah satu penanda MSCs yang baik adalah memiliki kemampuan mengekspresikan *surface marker* positif CD90 dan CD29 >95% dan marker negatif CD45 dan CD31 <2%.⁷²



Gambar 5.3. Hasil Immunophenotyping MSCs terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31 dengan analisis flowcytometry.

5.1.4. Efek Pemberian HMSCs terhadap Ekspresi CD68 pada tikus Wistar Model *Collagen Loss*

Marker CD68 merupakan spesifik penanda sel myeloid yang diekspresikan pada permukaan sel makrofag dan menjadi identitas marker yang umum digunakan untuk mengidentifikasi makrofag M1. Makrofag M1 berperan aktif dalam aktivasi sel T dan produksi sitokin yang berperan dalam respons imun. Ekspresi CD68 berkorelasi dengan progresivitas inflamasi yang dapat memicu kerusakan jaringan lebih lanjut. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi CD68 dengan metode PCR. Hasil menunjukkan bahwa penyinaran sinar UV-B meningkatkan ekspresi CD68 secara signifikan dibandingkan dengan kelompok Sehat (K1) ($p < 0.05$) (Gambar 5.4). Perubahan ekspresi CD68 terlihat berbeda nyata setelah adanya pemberian injeksi HMSCs, sementara pada kelompok kontrol positif (K3) yang diberikan injeksi HA

menunjukkan adanya penurunan ekspresi CD68 namun tidak signifikan.

Peneliti mendapatkan hasil bahwa injeksi HMSCs yang diberikan mampu menurunkan ekspresi gen CD68 pada jaringan kulit tikus model *collagen loss* secara signifikan bergantung pada dosis (Gambar 5.4 dan Tabel 5.1). Semakin tinggi dosis injeksi HMSCs yang diberikan, menunjukkan penurunan ekspresi CD68 yang lebih signifikan pula. Penurunan ekspresi gen CD68 paling optimal adalah pada kelompok K5 yang diberikan HMSCs dengan dosis 5×10^5 dalam 200 μ L NaCl dengan nilai 2.96 ± 1.02 yang berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok K2 ($p < 0.05$) (Tabel 5.1).

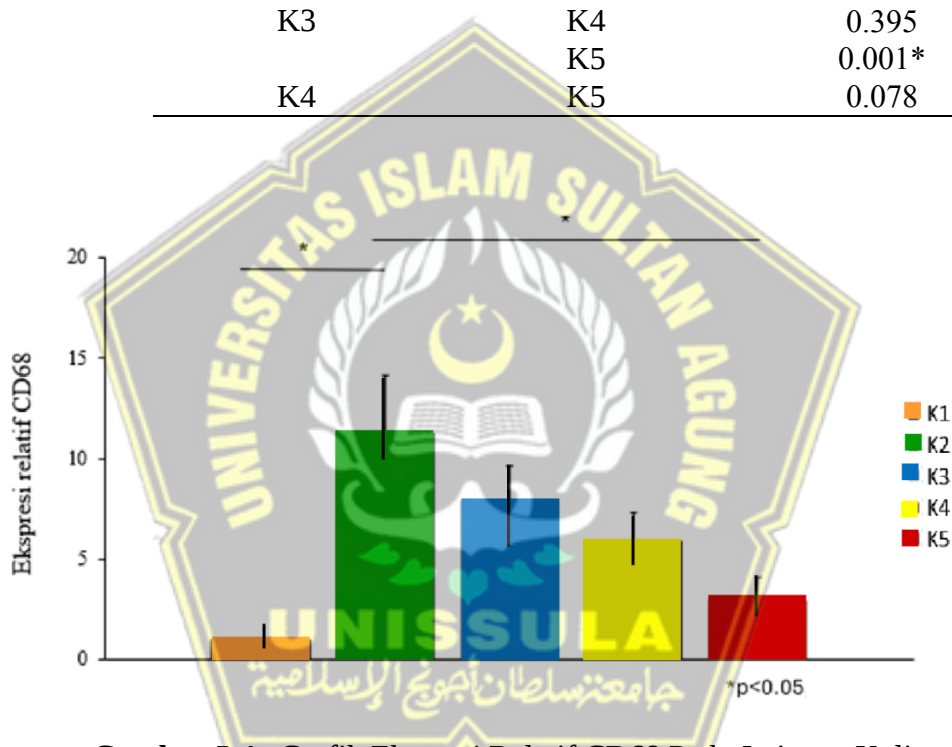
Setelah pemberian injeksi HMSCs menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok tikus sehat (K1) dengan kontrol negatif (K2) dan kontrol negatif (K2) dengan kelompok perlakuan (K5) ($p < 0.05$).

Tabel 5.1. Ekspresi CD68 pada jaringan kulit setelah injeksi HMSCs

Variabel	Kelompok					P
	K1 (ekspresi relatif) Rerata $\pm$ SD	K2 (ekspresi relatif) Rerata $\pm$ SD	K3 (ekspresi relatif) Rerata $\pm$ SD	K4 (ekspresi relatif) Rerata $\pm$ SD	K5 (ekspresi relatif) Rerata $\pm$ SD	
CD68 $\pm$	1.01 $\pm$	11.23 $\pm$	7.96 $\pm$	5.95 $\pm$	2.96 $\pm$	
Std dev	0.008	3.08	1.15	1.51	1.02	
Shapiro Wilk	0,314	0,922	0,056	0,332	0,958	>0,05
Lavene test						0,009
One Way ANOVA						0,000

Tabel 5.2. Perbedaan Rerata Ekspresi Gen CD68 antar Dua Kelompok dengan Uji Post-Hoc Tamhane

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0.018*
	K3	0.002*
	K4	0.019*
	K5	0.126
K2	K3	0.545
	K4	0.136
	K5	0.025*
K3	K4	0.395
	K5	0.001*
K4	K5	0.078



Gambar 5.4. Grafik Ekspresi Relatif CD68 Pada Jaringan Kulit

Pada data deskriptif, ekspresi CD68 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikasi semua kelompok $p > 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji parametrik One-way ANOVA. Adapun, pada uji homogenitas menunjukkan $p < 0.05$ yang menunjukkan distribusi

data tidak homogen sehingga dilakukan uji lanjutan menggunakan Uji Post-Hoc Tamhane. Uji beda One-way ANOVA didapatkan $p < 0,05$. Hasil uji Post-hoc Tamhane disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.4 dan tabel 5.2. Penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok K1 jika dibandingkan dengan K2 memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$ dan terdapat perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ antara kelompok K5 dengan K2.

5.1.5. Efek Pemberian HMSCs terhadap Kadar TNF- α pada tikus Wistar Model *Collagen Loss*

TNF- α merupakan salah satu jenis sitokin proinflamasi yang memainkan peran penting dalam respon imun dan inflamasi. Konsentrasi TNF- α meningkat selama degradasi kolagen. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan kadar TNF- α dengan metode ELISA. Hasil menunjukkan bahwa penyinaran sinar UV-B meningkatkan kadar TNF- α secara signifikan dengan nilai 369.30 ± 57.51 pg/ml dibandingkan dengan kelompok Sehat (K1) yaitu 66.60 ± 40.98 pg/ml ($p < 0.001$) (Gambar 5.5). Perubahan kadar TNF- α terlihat berbeda nyata setelah adanya pemberian injeksi HA maupun HMSCs, namun penurunan kadar TNF- α signifikan lebih rendah pada kelompok perlakuan yang diberikan injeksi HMSCs.

Peneliti mendapatkan hasil bahwa injeksi HMSCs yang diberikan mampu menurunkan kadar TNF- α pada jaringan kulit tikus model *collagen loss* secara signifikan pada masing-masing kelompok perlakuan dosis, baik pada dosis rendah (K4) maupun dosis tinggi (K5) (Gambar 5.5 dan Tabel 5.3). Semakin tinggi dosis injeksi HMSCs yang diberikan, menunjukkan penurunan kadar TNF- α yang

lebih signifikan ($p < 0.001$). Penurunan kadar TNF- α paling optimal adalah pada kelompok K5 yang diberikan HMSCs dengan dosis 5×10^5 dalam 200 μL NaCl dengan nilai 80.50 ± 23.46 pg/ml hingga mendekati kondisi normal seperti pada kelompok sehat yaitu 66.60 ± 40.98 pg/ml (Tabel 5.3).

Gambar 5.5 menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok tikus sehat (K1) dengan kontrol negatif (K2) ($p < 0.001$) dan kontrol negatif (K2) dengan kelompok perlakuan (K4 & K5) ($p < 0.001$).

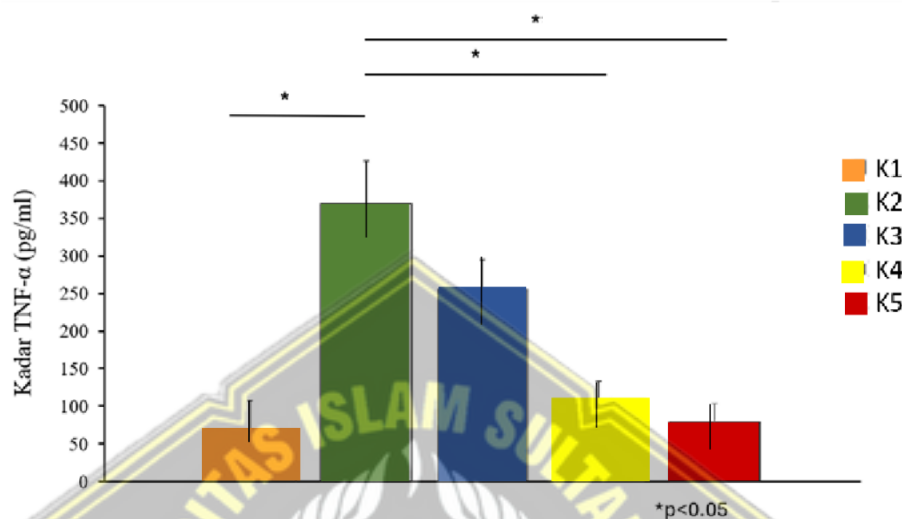
Tabel 5.3. Kadar TNF- α pada jaringan kulit setelah injeksi MSCs

Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
	(kadar)	(kadar)	(kadar)	(kadar)	(kadar)	
	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	
TNF- α	$66.60 \pm$	$369.30 \pm$	$256.50 \pm$	$110.50 \pm$	$80.50 \pm$	
Std dev	40.98	57.51	38.51	22.61	23.46	
Shapiro Wilk	0,260	0,136	0,830	0,126	0,700	$>0,05$
Lavene test						0,402
One Way ANOVA						0,000

Tabel 5.4. Perbedaan Rerata kadar TNF-alpha antar Dua Kelompok dengan Uji Post-Hoc LSD

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0.000*
	K3	0.000*
	K4	0.089
	K5	0.578
K2	K3	0.000*
	K4	0.000*
	K5	0.000*

K3	K4	0.000*
	K5	0.000*
K4	K5	0.236



Gambar 5.5. Grafik kadar TNF- α pada jaringan kulit setelah pemberian injeksi MSCs

Pada data deskriptif, kadar TNF- α masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok $p > 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji parametrik One-way ANOVA, dan dilanjutkan uji Post-hoc LSD. Uji beda One-way ANOVA didapatkan $p < 0,05$. Hasil uji Post-hoc LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.5 dan tabel 5.3. Penelitian ini menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ antara kelompok K4 dan K5 dengan K2.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Paparan iradiasi UVB adalah faktor resiko utama fotoaging kulit yang berakibat *collagen loss* dan hiperpigmentasi, ditandai dengan kondisi inflamasi, penumpukan melanin dan penurunan sintesis kolagen. Iradiasi sinar UVB menginduksi kerusakan DNA melalui pembentukan ROS oksidatif, yang mengakibatkan aktivasi beberapa jalur sintesis melanin, inaktivasi jalur sintesis kolagen, proses inflamasi dan mengakibatkan terbentuknya kanker kulit. Paparan UV-B menyebabkan kerusakan sel yang memicu modulasi makrofag (CD68) sebagai bagian dari respons imun untuk membersihkan sel-sel yang mati dan rusak, serta mensekresikan sitokin-sitokin proinflamasi seperti TNF- α .

Terapi saat ini tidak semuanya memberikan hasil maksimal terutama dalam mencegah degradasi kolagen, beberapa agen menimbulkan efek samping merugikan seperti genotoksisitas dan iritasi kulit.⁷³ Penelitian terkini membuktikan bahwa *Hypoxic-Mesenchymal Stem Cells* (HMSCS) dapat menginduksi sekresi mediator-mediator dan *growth factor* yang mendukung regenerasi melalui kemampuannya untuk mengatur respons sistem kekebalan tubuh melalui faktor imunomodulasinya.

Penyinaran UV-B untuk menginduksi *collagen loss* pada studi ini berhasil dilakukan terbukti pada hasil validasi pengamatan fisik dan mikroskopik pada Gambar 5.1. Hasil pengukuran pada kelompok kontrol negatif sebagai salah satu kelompok yang terpapar sinar UVB menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen CD68 dan kadar TNF- α yang lebih tinggi

secara signifikan dibandingkan dengan kelompok tikus sehat (Gambar 5.4 dan Gambar 5.5). Hal ini dapat terjadi karena adanya paparan UVB memodulasi infiltrasi makrofag M1 (CD68). Kerusakan kulit oleh UV secara berulang akan merepetisi siklus infiltrasi makrofag pada setiap paparannya. Infiltrasi makrofag yang secara terus menerus pada akhirnya menyebabkan kerusakan ECM dermis secara berkelanjutan karena pelepasan MMP dan ROS. Selain itu, peningkatan kadar TNF- α juga tidak terlepas dari pengaruh paparan UVB yang secara langsung merangsang keratinosit untuk memproduksi sitokin proinflamasi TNF- α . Adanya aktivasi faktor transkripsi NF- κ B oleh UVB juga berkontribusi langsung dalam peningkatan transkripsi gen TNF- α .^{42,43}

Pemberian injeksi HMSCs memberikan pengaruh positif yang signifikan terhadap kondisi *collagen loss*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian injeksi HMSCs berhasil menurunkan ekspresi gen CD68 ($p < 0.05$) dan kadar TNF- α ($p < 0.001$) secara signifikan. Penurunan ekspresi gen CD68 dan kadar TNF- α ini bergantung pada dosis yang diberikan (*dose-dependent manner*), artinya seiring dengan semakin tinggi dosis HMSCs yang diberikan menunjukkan ekspresi CD68 dan TNF- α yang lebih rendah. Pengukuran ekspresi gen CD68 pada kelompok injeksi HMSCs K4 menunjukkan penurunan sebanyak 2x lebih rendah, sementara pada kelompok injeksi HMSCs K5 menunjukkan hasil penurunan $\pm$ 3-4x lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K2 yang hanya diberikan NaCl sebagai pelarut dari HMSCs. Hal tersebut sekaligus membuktikan

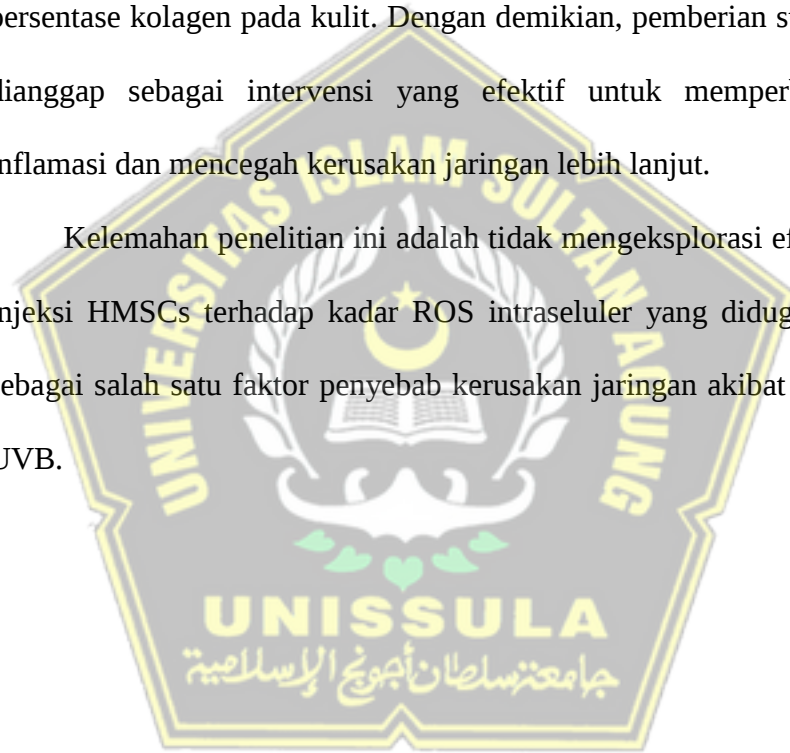
pemberian pelarut HMSCs tidak memberikan pengaruh terhadap injeksi HMSCs yang diberikan, artinya pengaruh ekspresi yang terjadi murni berdasarkan dari kemampuan HMSCs. Pengukuran kadar TNF- α juga menunjukkan hasil yang serupa, dimana kelompok injeksi HMSCs K4 menunjukkan penurunan sebanyak 2x lebih rendah, sementara pada kelompok injeksi HMSCs K5 menunjukkan hasil penurunan $\pm 4x$ lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K2. Kemampuan HMSCs dalam menurunkan kadar TNF- α ini juga dibuktikan dalam penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa pemberian secretome HMSCs dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada ginjal tikus model DM tipe 2.

Hasil eksperimen ini menunjukkan bahwa injeksi HMSCs yang diberikan berhasil memperbaiki respon inflamasi dan membantu mengembalikan kondisi jaringan pada keadaan yang lebih sehat. Hal tersebut diwakilkan oleh hasil injeksi kelompok K4 dan K5 yang menunjukkan ekspresi CD68 dan TNF- α yang menurun. Pemberian injeksi pada kelompok K4 dengan dosis HMSCs 2.5×10^5 telah menunjukkan hasil penurunan ekspresi CD68 dan kadar TNF- α yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok K3. Adapun injeksi kelompok K5 dengan dosis HMSCs 5×10^5 dapat disimpulkan sebagai injeksi dengan dosis yang optimum karena menunjukkan hasil mendekati kondisi normal. Injeksi HMSCs membantu mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh inflamasi dan dapat mengontrol respon imun. Penurunan ekspresi gen CD68 ini saling berkorelasi dengan penurunan kadar TNF- α . Hal ini dapat terjadi karena

adanya mekanisme molekuler HMSCs yang memiliki kemampuan meningkatkan sekresi vesikel ekstraseluler atau eksosom yang mengandung berbagai enzim antioksidan, dan miRNA spesifik yang dapat diinternalisasi oleh makrofag. miRNA ini menargetkan mRNA tertentu yang berperan dalam jalur proinflamasi, sehingga mengurangi ekspresi sitokin proinflamasi dan menghambat polarisasi makrofag ke fenotipe M1. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa miRNA-148a dalam vesikel ekstraseluler MSCs menargetkan Kruppel-like factor 6 (KLF6). Dengan menghambat KLF6, miRNA-148a dapat mengurangi polarisasi makrofag ke fenotipe M1 dan mendorong transisi ke fenotipe M2 yang antiinflamasi.⁷⁴ Selain itu, MSCs yang terpapar hipoksia meningkatkan sekresi PGE₂, yang berinteraksi dengan reseptor EP2 dan EP4 pada makrofag, menghambat aktivasi jalur NF- κ B, sehingga menurunkan ekspresi gen proinflamasi dan mengurangi polarisasi makrofag ke fenotipe M1.⁷⁴ Mekanisme lain yang dapat menjelaskan penurunan ekspresi makrofag M1 (CD68) dan inflamasi TNF- α oleh MSCs ini karena HMSCs meningkatkan kemampuan anti-inflamasinya dengan mengekspresikan kadar TGF- β dan IL-10 dalam jumlah yang tinggi. Adanya TGF- β berperan penting dalam berkontribusi memicu polarisasi makrofag mengarah ke fenotipe M2 dan mengurangi respon inflamasi.⁷⁵ IL-10 juga berperan penting dalam menurunkan inflamasi dan mencegah degradasi kolagen via *Supressor of Cytokine Signalling-3* (SOCS3). Hal ini dapat terjadi karena IL-10 dapat mengaktifasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentraslokasi

kedalam nucleus untuk memicu ekspresi gen responsive STAT3, yaitu *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3).⁶⁶ Mekanisme tersebut memicu ekspresi molekul-molekul anti inflamasi yang berperan penting dalam meregulasi ekspresi makrofag dan kadar TNF- α . Sehingga dengan adanya molekul-molekul penting yang terdapat oleh HMSCs tersebut berkontribusi penting pada mekanisme penghambatan *photoaging* dan peningkatan persentase kolagen pada kulit. Dengan demikian, pemberian stem cell dapat dianggap sebagai intervensi yang efektif untuk memperbaiki kondisi inflamasi dan mencegah kerusakan jaringan lebih lanjut.

Kelemahan penelitian ini adalah tidak mengeksplorasi efek pemberian injeksi HMSCs terhadap kadar ROS intraseluler yang diduga secara kuat sebagai salah satu faktor penyebab kerusakan jaringan akibat paparan sinar UVB.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian injeksi HMSCs secara subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel (K4) dan 5×10^5 sel (K5) berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan ekspresi CD68 pada tikus model collagen loss yang diinduksi paparan sinar UVB.
2. Pemberian injeksi HMSCs secara subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel (K4) dan 5×10^5 sel (K5) berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan kadar TNF- α pada tikus model collagen loss yang diinduksi paparan sinar UVB.
3. Pemberian injeksi HMSCs secara subkutan menunjukkan hasil *dose-dependent manner* yang mana injeksi dengan dosis 5×10^5 sel (K5) dinilai lebih optimal karena menunjukkan hasil ekspresi CD68 dan kadar TNF- α mendekati kondisi normal.
4. Terdapat korelasi positif antara penurunan ekspresi CD68 dengan penurunan kadar TNF- α .

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah :

- Perlu pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian injeksi HMSCs pada tikus model *collagen loss*.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Son DJ, Jung JC, Choi YM, Ryu HY, Lee S, Davis BA. Wheat extract oil (WEO) attenuates UVB-induced photoaging via collagen synthesis in human keratinocytes and hairless mice. *Nutrients* 2020. doi:10.3390/nu12020300.
- 2 Phipps KR, Lee HY, Kim H, Jeon B. Oral administration of a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract (BioCell Collagen®) reduces UVB-induced photoaging in mice. *J Funct Foods* 2020. doi:10.1016/j.jff.2020.103870.
- 3 Kang YM, Hong CH, Kang SH, Seo DS, Kim SO, Lee HY *et al.* Anti-photoaging effect of plant extract fermented with *Lactobacillus buchneri* on CCD-986sk fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *J Funct Biomater* 2020. doi:10.3390/jfb11010003.
- 4 He X, Dong Z, Cao Y, Wang H, Liu S, Liao L *et al.* MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing. 2019; **2019**.
- 5 Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S *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**: 1–7.
- 6 Green AC, Hughes MC, McBride P, Fourtanier A. Factors associated with premature skin aging (photoaging) before the age of 55: a population-based study. *Dermatology*. 2011 Feb;222(1):74-80. doi: 10.1159/000322623. Epub 2010 Dec 29. PMID: 21196710.
- 7 Manriquez JJ, Karina C, Cristian V, Isidora H. Wrinkles. *Clinical Evidence*. 2014; 12:1711
- 8 Tranggono RIS, Adityrini. Cosmeceuticals for Asians who are living in the tropics. *Journal of Applied Cosmetology*. 2010; 28:71-86.
- 9 Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *J Biomed Technol Res* 2014; **1**: 1–21.
- 10 Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji HL *et al.* Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016; **7**. doi:10.1038/cddis.2015.327.
- 11 English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013; **91**: 19–26.

- 12 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; 38: 164.
- 13 Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Molecular Therapy* 2018; **26**: 606–617.
- 14 Hu S, Li Z, Cores J, Huang K, Su T, Dinh PU *et al.* Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging. *ACS Nano* 2019; **13**: 11273–11282.
- 15 You Y, Tian Y, Yang Z, Shi J, Kwak KJ, Tong Y *et al.* Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy. *Nat Biomed Eng* 2023; **7**: 887–900.
- 16 Balasubramanian S, Thej C, Walvekar A, Swamynathan P, Gupta PK, Seetharam RN *et al.* Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 2017; **07**: 99–117.
- 17 Liang JX, Liao X, Li SH, Jiang X, Li ZH, Wu YD, Xiao LL, Xie GH, Song JX, Liu HW. Antiaging Properties of Exosomes from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Photoaged Rat Skin. *Biomed Res Int.* 2020 Dec 21;2020:6406395. doi: 10.1155/2020/6406395.
- 18 Feduska JM & Tse HM. The proinflammatory effects of macrophage-derived NADPH oxidase function in autoimmune diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* 2018
- 19 Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, Farronato G, Bruno A, & Mortara L. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders?. *Journal of immunology research* 2018; 8917804.
- 20 Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014 Oct 7;5:491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491. PMID: 25339958; PMCID: PMC4188125.
- 21 Parkinson LG, Toro A, Zhao H, Brown K, Tebbutt SJ, Granville DJ. Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation. *Aging Cell* 2015. doi:10.1111/acel.12298

- 22 Hwang E, Lee DG, Park SH, Oh MS, Kim SY. Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type i and MMP-1 expression. *J Med Food* 2014; **17**: 985–995
- 23 Chiang HM, Chen HC, Chiu HH, Chen CW, Wang SM, Wen KC. Neonauclea reticulata (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after uvb exposure via Ros scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2013; **2013**. doi:10.1155/2013/324864.
- 24 Bosset S, Bonnet-Duquennoy M, Barre P, Chalon A, Kurfurst R, Bonte F, Schnebert S, Le Varlet, Nicolas JF. Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. *Br. J. Dermatol.* 2003; 149(4):826-835
- 25 Zhuang Y and John L. Inflammaging in Skin and Other Tissues - The Roles of Complement System and Macrophage. *Inflammation & Allergy- Drug Targets* 2014; 13:153-161
- 26 Nosenko MA, Ambaryan SG, Drutskaya MS. Proinflammatory Cytokines and Skin Wound Healing in Mice. *Mol Biol.* 2019;53(5):653-664. doi:10.1134/S0026893319050121
- 27 Zulaikhah ST, Wahyuwibowo J, Suharto MN, Enggartiasto BH, Ortanto MIR, Pratama AA. Effect of Tender Coconut Water (TCW) on TNF- α , IL-1 and IL-6 in Streptozotocin (STZ) and Nicotinamid (NA) Induced Diabetic Rats. *Pharmacogn J.* 2021;13(2):500-505. doi:10.5530/pj.2021.13.63
- 28 Nugraha J. Macrophage Autophagy in Immune Response. *Indones J Clin Pathol Med Lab.* 2018;24(1):95. doi:10.24293/ijcpml.v24i1.1164
- 29 Lampropoulou IT, Stangou M, Sarafidis P, et al. TNF- α pathway and T-cell immunity are activated early during the development of diabetic nephropathy in Type II Diabetes Mellitus. *Clin Immunol.* 2020;215:108423. doi:10.1016/J.CLIM.2020.108423
- 30 Omote K, Gohda T, Murakoshi M, et al. Role of the TNF pathway in the progression of diabetic nephropathy in KK-A(y) mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(11). doi:10.1152/AJPRENAL.00509.2013
- 31 Hu J, Liu X, Chi J, et al. Resveratrol Enhances Wound Healing in Type 1 Diabetes Mellitus by Promoting the Expression of Extracellular Vesicle-Carried MicroRNA-129 Derived from Mesenchymal Stem Cells. *J Proteome Res.* 2022;21(2):313-324.

- 32 Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation : Impact on Stability ,. 2016;4(February):1-14. doi:10.3389/fcell.2016.00011
- 33 Lee DC, Choi H, Oh J-M, et al. Urban particulate matter regulates tight junction proteins by inducing oxidative stress via the Akt signal pathway in human nasal epithelial cells. Published online 2020.
- 34 Hornsby PJ. Regulation of cytochrome P-450-supported 11 β -hydroxylation of deoxycortisol by steroids, oxygen, and antioxidants in adrenocortical cell cultures. *J Biol Chem.* 1980;255(9):4020-4027. doi:10.1016/S0021-9258(19)85626-0
- 35 Pu X, Storr SJ, Zhang Y, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis.* 2017;22(3):357-368. doi:10.1007/s10495-016-1323-5
- 36 M M, E C, M N, et al. Pro-inflammatory M1/Th1 type immune network and increased expression of TSG-6 in the eutopic endometrium from women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;218:99-105. doi:10.1016/J.EJOGRB.2017.08.014
- 37 Bakshi HA, Quinn GA, Nasef MM, et al. Crocin Inhibits Angiogenesis and Metastasis in Colon Cancer via TNF- α / NF- κ B/VEGF Pathways. *Cells.* 2022;11(9):1-15. doi:10.3390/cells11091502.
- 38 Li M, Xu J, Shi T, Yu. H, Bi J, Chen G. Epigallocatechin-3-gallate augments therapeutic effects of mesenchymal stem cells in skin wound healing. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(11):1115-1124. doi:10.1111/1440-1681.12652
- 39 Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, Malik SG. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes.* 2013;6(1):0-7. doi:10.1186/1756-0500-6-275
- 40 Lakshmanan J, Zhang B, Wright K, et al. Tender coconut water suppresses hepatic inflammation by activating AKT and JNK signaling pathways in an in vitro model of sepsis. *J Funct Foods.* 2020;64:103637. doi:10.1016/J.JFF.2019.103637
- 41 Tafani M, Sansone L, Limana F, et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/3907147

- 42 Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ, Chiang HM. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3 β -ol, Isolated from *Antrodia camphorata*, on Hairless mouse skin. *Molecules* 2016; **21**: 1–14
- 43 Cooper S, Bowden G. Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) and Activator Protein-1 (AP-1) in UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; **7**: 325–334.
- 44 Gupta A, Kaur CD, Jangdey M, Saraf S. Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy. *Ageing Res Rev* 2014; **13**: 65–74.
- 45 Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation- mediated skin aging. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. doi:10.3390/ijms22083974.
- 46 Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
- 47 Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry. Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958
- 48 Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol Clin* 2010; **28**: 93–105.
- 49 Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells* 2019; **12**: 218–226.
- 50 Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems* 2018
- 51 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. 2019; **38**: 164–171
- 52 Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 2019; **10**: 1–10
- 53 Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014; : 135–156.
- 54 Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep* 2016; **2**: 168–173.

- 55 Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19092783.
- 56 Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M et al. Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; 7: 305–310.
- 57 Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014; 12: 1–14.
- 58 Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *J Clin Med* 2019, Vol 8, Page 1025. 2019;8(7):1025. doi:10.3390/JCM8071025
- 59 Mrahleh M Al, Matar S, Jafar H, Wehaibi S, Aslam N, Awidi A. Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells Primed by Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ Modulate the Innate and Adaptive Immune Cells of Type 1 Diabetic Patients. *Front Immunol*. 2021;12:3906. doi:10.3389/FIMMU.2021.732549/BIBTEX
- 60 Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; **11**. doi:10.3390/nu11061341
- 61 Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, Malik SG. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes* 2013; **6**: 0–7.
- 62 Brand RM, Wipf P, Durham A, Epperly MW, Greenberger JS, Falo LD. Targeting mitochondrial oxidative stress to mitigate UV-induced skin damage. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 1–10.
- 63 Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pereira Lima GP. Antioxidant activity of Y-oryzanol: A complex network of interactions. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17081107.
- 64 Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ *et al*. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 392–400.

- 65 Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC *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**: 1779–1783.
- 66 Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules* 2020; **10**: 1–15.
- 67 Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupar J, Yang X *et al.* TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* 2013; **32**: 1549–1559.
- 68 Chen X, Chunseng Y, Guan J. Research progress on skin photoaging and oxidative stress. *Advance in Dermatology and Allergology* 2021; 6:931-936
- 69 Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, Liu C, Liu J, Luo Y. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Rev Rep.* 2022 Jun;18(5):1525-1545. doi: 10.1007/s12015-022-10369-1. Epub 2022 Mar 28. PMID: 35344199; PMCID: PMC8958818.
- 70 Bühring H., Venkata LB, Sabrina T, Bernhard S, Lothar K., Wichard V. Novel Markers for the Prospective Isolation of Human MSC. *The New York Academy of Science* 2007; 1106:262-271
- 71 Morgan NH, Arakeep HM, Haiba DA, Aboelgoud MA. Role of Masson's trichrome stain in evaluating the effect of platelet-rich plasma on collagenesis after induction of thermal burn in adult male albino rats. *Tanta Medical Journal* 2022 50(2):p 86-93
- 72 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
- 73 Cheng SL, Liu RH, Sheu JN, Chen ST, Sinchaikul S, Tsay GJ. Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *J Biomed Sci.* 2007 Jan;14(1):87-105. doi: 10.1007/s11373-006-9130-6. Epub 2006 Nov 11. PMID: 17103032.
- 74 Chen Y, Yang L, Li X. Advances in Mesenchymal stem cells regulating macrophage polarization and treatment of sepsis-induced liver injury. *Front Immunol.* 2023 Oct 25;14:1238972. doi: 10.3389/fimmu.2023.1238972. PMID: 37954578; PMCID: PMC10634316.

- 75 Wang, Y., Han, B., Wang, Y., Wang, C., Zhang, H., Xue, J., Wang, X., Niu, T., Niu, Z., & Chen, Y. (2020). Mesenchymal stem cell-secreted extracellular vesicles carrying TGF- β 1 up-regulate miR-132 and promote mouse M2 macrophage polarization. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(21), 12750–12764.
- 76 Irawan, RCS., Putra, A., Trisnadi, S., Ghaissani, SS and Hidayah N. 2023. Secretome hypoxia- mesenchymal stem cells decrease tumor necrosis factor- α and interleukin-18 in kidney of type 2 diabetes mellitus model rats. *Univers Medicina*, 42(3), 320-328

