

LAPORAN KEMAJUAN
PROGRAM PENELITIAN KOLABORASI INDONESIA



JUDUL PENELITIAN

**Establishment of purification and characterization method for
ginger-derived exosome like nanoparticle and its anti-
inflammatory activity**

SUB JUDUL PENELITIAN

**Peningkatan Produksi dan Kualitas *Exosom-like (PDEN)* dari Tiga Varietas Jahe. dan
Aplikasinya pada Pangan Fungsiona**

Peneliti Utama ITB : Dr. Anggraini Barlian

Peneliti Mitra IPB : 1. Prof. Dr. Ir. C. Hanny Wijaya. M.Agr.

2. Prof. Dr . Diah Ratnadewi

Peneliti Mitra UGM : Prof. Ika Dewi Ana PhD

HALAMAN PENGESAHAN

Judul	:	Establishment of purification and characterization method for ginger derived exosome-like nanoparticles and its anti-inflammatory activity
Skema	:	RKI - C
Peneliti Mitra IPB	:	
1. Nama Lengkap	:	Prof. C. Hanny Widjaja, MSc., PhD.
NIP	:	196004221983032003
Jabatan Fungsional	:	Guru Besar
Fakultas	:	Teknologi Pertanian
Alamat Kantor/ Telp/ Surel	:	Kampus IPB Darmaga, Jl. Lingkar Akademik, Babakan, Kec. Dramaga, Kabupaten Bogor, Jawa Barat 16680 channywijaya@apps.ipb.ac.id
2. Nama Lengkap	:	Prof. Dr. Ir. Yuliana Maria Diah Ratnadewi, D.E.A.
NIP	:	195703261981032001
Jabatan Fungsional	:	Guru Besar
Fakultas	:	MIPA
Alamat Kantor/ Telp/ Surel	:	Kampus IPB Darmaga, Jl. Lingkar Akademik, Babakan, Kec. Dramaga, Kabupaten Bogor, Jawa Barat 16680 dratnadewi@apps.ipb.ac.id
Peneliti Utama ITB	:	
Nama Lengkap	:	Dr. Anggraini Barlian, MSc.
NIP	:	196304131988112001
Perguruan Tinggi	:	Institut Teknologi Bandung
Alamat Surel	:	aang@sith.itb.ac.id
Peneliti Mitra UGM	:	
Nama Lengkap	:	Prof. drg. Ika Dewi Ana, M.Kes., PhD.
NIP	:	1968091994032001
Perguruan Tinggi	:	Univeristas Gajahmada
Surel	:	ikadewiana@ugm.ac.id
Biaya yang Disetujui	:	Rp 75.000.000,00

Mengetahui,
Kepala LPPM IPB



Prof. Dr. Ir. Ernan Rustiadi, M.Agr.
NIP. 196510111990021002

Bogor, 7 Desember 2022
Peneliti Mitra

Prof. C. Hanny Widjaja, MSc., PhD.
NIP. 196004221983032003

RINGKASAN

Exosom-like (PDEN) jahe gajah telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi pada penelitian sebelumnya. Hasil menunjukkan bahwa penyediaan dan aplikasi PDEN lebih efektif dibandingkan dengan eksosom. Pada penelitian kolaborasi ini direncanakan untuk menggali lebih lanjut potensi PDEN pada kemampuan anti-inflamasi baik pada sel paru, sel pencernaan maupun sel-sel peridontal. Pihak mitra luar negeri telah menemukan cara untuk memproduksi eksosom dari susu dengan biaya rendah dan cara relatif sederhana (gel filtrasi). Selain itu, pihak peneliti mitra luar negeri juga memiliki metode efektif dengan penggunaan marker yang dikenal dengan nama GIF-2250 untuk menentukan mutu eksosom yang diperoleh. Oleh karena itu, peneliti mitra IPB merencanakan penelitian guna memperoleh metode penyiapan PDEN yang efisien dan ekonomis dengan membandingkan hasil ekstraksi dari rimpang 3 varietas jahe (jahe gajah, emprit dan merah) yang diperoleh dari pasar dengan menggunakan metode yang telah dilakukan sebelumnya (ultrasentrifugasi) dan metode mitra (filtrasi dan separasi dg HPLC-Gel), dilanjutkan dengan pengujian kualitas PDEN yang diperoleh dengan metode konvensional dan metode baru dari mitra. Modifikasi dari metode ekstraksi diharapkan dapat menghasilkan PDEN yang potensial untuk digunakan oleh peneliti utama dan peneliti mitra yang lain. Bila memungkinkan akan dilakukan juga identifikasi isi dari PDEN yang dihasilkan serta perbandingan dengan kualitas PDEN yang diperoleh dari bentuk kalus (kultur jaringan) jahe dan rimpang jahe segar. Pada tahun kedua, metode ekstraksi yang diperoleh akan dioptimasi dan dicoba digunakan untuk mengekstraksi dari rimpang pada 4 umur panen dan rimpang-rimpang lain yang menjanjikan aktivitas fisiologis aktif yang baik. Pada tahun kedua juga akan dilakukan aplikasi PDEN yang diperoleh pada produk pangan fungsional. Pada penelitian tahun pertama telah tersedia PDEN untuk diimplementasikan pada peneliti Utama dan peneliti Mitra UGM. Hasil tahun pertama menunjukkan bahwa metode ultrasentrifugasi dapat menghasilkan PDEN yang mampu masuk ke dalam sel paru dengan baik, namun kurang mampu untuk masuk ke sel makrofag. Perbaikan metode dengan metode filtrasi belum memberikan hasil yang diharapkan, akan dilakukan perbaikan metode. Fenomena lain yang perlu diamati dan dicarikan solusi adalah ketidak-stabilan PDEN yang cenderung bergabung membentuk partikel yang lebih besar. Dari pengamatan aktivitas antioksidan terlihat bahwa varietas jahe berpengaruh besar pada kapasitas antioksidan yang dimiliki. Varian emprit memiliki kapasitas antioksidan, diikuti dengan jahe merah dan jahe gajah. Perlu dilanjutkan penelitian untuk pemantapan metode pada tahun kedua bersamaan dengan aplikasi pada pangan fungsional

1 PENDAHULUAN

1.1. Background problems

Exosomes are extracellular vesicles produced by cells with a size range of 30–100 nm (Akuma, Okagu, and Udenigwe 2019). Exosomes contain proteins, metabolites, and genetic materials and play a role in intracellular communication. The cargo of exosomes depends on its cellular origin. Exosomes produced by stem cells have anti-inflammatory properties (Harrell et al. 2019). Many studies have shown the existence of plant-derived exosomes-like nanoparticles (PDEN) and that they have a similar potential to mammalian-derived exosomes.

Ginger is a medical plant that is widely used all over the world. One of the main physiological actions of ginger is anti-inflammatory. Indonesia has a high diversity of ginger cultivars and each cultivar may show different pharmacological properties. The potential health benefits associated with ginger can also be found in its PDEN. A previous study showed that ginger-derived PDEN inhibited NLRP3 inflammasome activation (Chen, Zhou, and Yu 2019).

Exosomes have been studied in Indonesian Research Collaboration (RKI) Program for the past two years. Exosomes isolation and purification methods were optimized in previous research. Exosomes' potential use in regenerative medicine is also being investigated. We have published three articles in international journals (Q1 and Q2) and held a national webinar to raise awareness about the potential use of exosomes in medicine. In this study, we are attempting to develop isolation methods for plant-derived exosomes such as nanoparticles (PDEN), particularly PDEN from ginger in different cultivars.

Based on our previous study in RKI 2020-2021, despite the potential properties of exosomes in health applications, we concluded that the research using exosomes requires high research expense and facilities. Meanwhile, in Gifu University, Japan, they already established low cost yet high efficiency methods for the purification of the milk-derived exosome. Therefore, the exchange of potentials between Indonesia with its high biodiversity of medicinal plants for PDEN, and Japan with high efficiency methods for exosome purification, could be achieved through this research collaboration. Furthermore, the results from this research plan could enhance the readiness level for mass production of PDEN for health application products with standardized methods (readiness level : 3).

1.2. Objective

The research aims to optimize the isolation and purification methods of ginger-derived nanoparticles like exosomes using the established method from Gifu University, and compare their function to that of mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosomes in reducing inflammation in vitro in human lung cells and apply it to periodontitis case in vivo. The findings of the study can be used to enhance the readiness level for mass production of PDEN for health application products with standardized methods.

2 METODE PENELITIAN

2.1. Pencarian petani jahe merah, emprit dan gajah

Identifikasi petani jahe yang mungkin menyediakan rimpang jahe pada 4 umur panen yang berbeda untuk persiapan penelitian pada tahun kedua. .

2.2. Pelanjutan penumbuhan kultur jaringan jahe

Pada penelitian sebelumnya telah dicoba untuk menumbuhkan kalus kultur jaringan dari jahe. Penumbuhan kalus akan dilanjutkan pada penelitian ini dengan upaya mengurangi kontaminan.

2.3. Extraction and Particles Isolation

2.3.1 Metode ekstraksi dengan PEG 600 dan ultrasentrifus. (metode yang optimum pada penelitian sebelumnya)

Fresh ginger rhizome was peeled off and immediately crushed in a blender. As much as 2-3 g of the crushed rhizome and the quina callus were mixed with 10 mL aquabidest by vortexing for about 1 min. The mixture was passed through 100 μ m nylon filter to get the filtrate. The extraction was carried out through differential centrifugation steps, in aquabidest. We followed two procedures: the first was Procedure A described by Kalarikkal et al. (2020) and the second was Procedure B by Woith & Melzig (2019) with slight modification. The two procedures differ in the centrifugation steps of isolation. The PDENs isolation was carried out using refrigerated (4 °C) centrifuge (Centurion Sci. K3 Series, UK) and refrigerated ultracentrifuge (Himac CS150NX, Japan). The supernatan collected from the last centrifugation step was mixed with Polyethylene Glycol (PEG6000, BDH, England. 1:1 v/v) will be used as the precipitating agent. The mixture was homogenized by vortexing, then it was incubated overnight at 4 °C . In the following day, the mixture proceeded to centrifugation; the upper liquid was removed very carefully, and the precipitated pellet was dissolved in aquabidest or 1xPBS (1:1 v/v).

2.3.2 Metode Filtrasi HPLC-Gel (metode dari pihak mitra luar negeri)

Prinsip dari metode ini adalah filtrasi menggunakan filter milipore 1,2-0.8-0.45 μ m. Rimpangjahe segar diblender dalam aquabides lalu disonifikasikan dan disaring dengan saringan nilon 50-100 μ m. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diekstraksi kembali saringan milipore dan dipurifikasi dengan separasi HPLC-Gel

2.4. Observation and Evaluation of PDENs

2.4.1 Pengamatan dengan TEM

The isolated samples were observed through a Transmission Electron Microscope (TEM, Hitachi HT-7700, Japan) by using negative staining method, to observe the particles morphology. Dynamic Light Scattering (DLS) and Particle Size Analysis (PSA) (Horiba SZ100 nanoparticle analyzer, Japan) were performed to get the sizes of the particles along with their distribution. The analysis was set at 25 °C with the refractive index of 1.31 and viscosity of 0.89. The analysis and observation were done in triplicate.

2.4.2 Pengamatan dengan nanoparticle tracking analysis (NTA)

Apart from that, we also used NTA (nanoparticle tracking analysis) to reconfirm the PDENs size and concentration. Using a viewsizer (Horiba Sci., Japan. Type 3000/0053; camera AVTManta 319C), at 22 °C, 1 mL of PDEN samples was diluted in aquabidest. The average viscosity was 0.95 cP.

2.4.3 Pengamatan mutu PDEN dengan GIF-2250 (metode mitra luar negeri)

Prinsip dari metode ini adalah menggunakan senyawa penciri berflorosens yang dikembangkan oleh laboratorium peneliti mitra pada eksosom yang diperoleh sehingga dapat dilakukan pengujian secara kuantitatif, sekaligus berguna untuk standardisasi.

2.4.4 Analysis of cell uptake of the PDENs by human cells

The analysis of PDENs uptake by cells used human dermal fibroblast (HDF) and human Wharton's jelly mesenchymal (hWj MSC) stem cells. The PDEN was labelled by using PKH67 green fluorescent cell linker mini kit (Sigma-Aldrich) and following the protocol with slight modification. As much as 50 uL of the PDENs sample was mixed with 500 uL Diluent C; the same volume of Diluent C was also added to 2 uL PKH67. Both the PDENs samples and PKH67 in Diluents were mixed and the mixture was incubated in room temperature for 4 min. Subsequently, 1 mL 1% Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma) was added, and then it was incubated for additionally 1 min. The last mixture was uploaded into Amicon Ultra centrifugal filter units (Millipore) for a centrifugation at 4000 xg for 15 min. The pellet was washed with Phosphate Buffer Saline (PBS) three times, each time by passing through centrifugation. The solid sample (pellet) was dissolved in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-low glucose (Gibco) media equipped with 1% antibiotic-antimycotic solution (AbAm, Gibco), and ready for use. The stem cells were grown on coverslips in a six-wellplate with a density of 50,000 cells/well.

The cells' medium was composed of DMEM-low glucose, 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco) and 1% AbAm. The cells were incubated for two days at 37 °C and 5% CO₂. Then the mounting medium was removed through three washing passages with PBS. The cells were subsequently mixed with the labelled PDENs solution, and again incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 30 min and 21 hours. At the end of incubation, the uptaking process was stopped by fixing the PDEN-treated cells with 4% paraformaldehyde for 15 min. The cells were washed with PBS prior to the DAPI (ThermoFisher, USA) staining for 10 min. After the last wash with PBS, the cells were observed and imaged with a Confocal Laser Scanning Microscope (Olympus Fv1200).

2.4.5 Determination of antioxidant capacity and phenolic content

Antioxidant capacity of the three varieties of ginger was expressed in in ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC), according the method described by Batubara et al. (2009). The determination was done in triplicate.

Total phenolic content was measured according to Batubara et al (2020), by using 10% Folin–Cioclteu reagent. The absorbances were determined at 750 nm using a microplate reader (Epoch Biotek, Winooski, VT, USA). The phenolic content was measured in milligrams of gallic acid equivalent per gram of dried extract (mg GAE/g DW) using a gallic acid calibration curve. All samples were determined in triplicate.

2.5. Aplikasi pada pangan fungsional

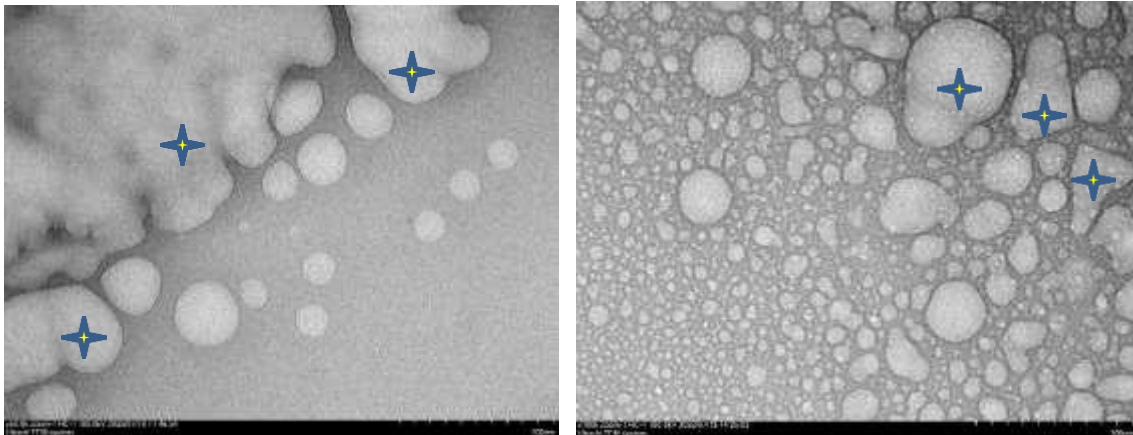
Penggunaan PDEN pada pangan fungsional akan disesuaikan dengan hasil pengamatan efikasi PDEN yang diperoleh.

3 HASIL PENELITIAN

Melihat hasil PSA yang terakhir (Agustus dan Juli 2022), di mana prosedur isolasinya menggunakan filter millipore 0.45 dan 0.22 um,

1. **Hasil Juli 2022** hanya dg Jahe Gajah (JG). Dengan metode terbaik dari tahun lalu (isolasi dg PEG6000 10%), dan disaring dg filter 0.45 dan 0.22 um (JG-A) dan dg 0.45 um (JG-B), lalu disentrifusi keesokan harinya pada 8000 xg 30 mt (JG-A8000 & JG-B8000) atau pada 10000 xg 30 mt (JG-A10000 & JG-B10000), kita dapatkan ukuran partikel yang reratanya masih di atas 1000 nm. Bahkan yang JG-A reratanya lebih besar daripada JG-B. Nilai itu membaik bila kita lihat bagian: particle size with the highest frequency, di mana rerata JG-A lebih kecil dari JG-B. Tahun 2021, kita belum menggunakan filter millipore, sehingga ukuran partikel berapa saja yg kita dapatkan dari proses sentrifugasi, dapat kita terima (sebagai fakta apa adanya).

Ini salah 2 foto partikel dari TEM di bulan Juli 2022:



Yang ditandai ✦ pada gambar di atas terlihat gumpalan-gumpalan besar di antara partikel kecil-kecil, dan bentuknya tidak pecah. Jadi menurut saya bukan lisis.

2. **Hasil isolasi Agustus 2022:** dilakukan pada JG, Jahe Merah (JM) dan Jahe Emprit (JE).

Metode ekstraksi dasarnya sama (sentrifusi 2000 xg 10 mt; 6000 xg 20 mt; 10000 xg 40 mt).

Lalu prosedur dibedakan menjadi 3 (2a; 2b1 & 2b2):

- **JG-1** mengikuti cara terbaik tahun 2021 hanya untuk JG (isolasi dg PEG6000 10%, tanpa filter millipore), sentrifusi terakhir pada 8000 xg 30 mt. Ini untuk **kontrol** apakah alat ukur di ITB masih berfungsi baik.
- **JG-2a, JM-2a, JE-2a:** Setelah ekstraksi dasar dengan sentrifusi 10000 xg, 40 mt, supernatan disaring dg 0,45 & 0,22 um. Filtrat disimpan semalam di kulkas. Larutan tetap dlm aquabidest utk PSA.

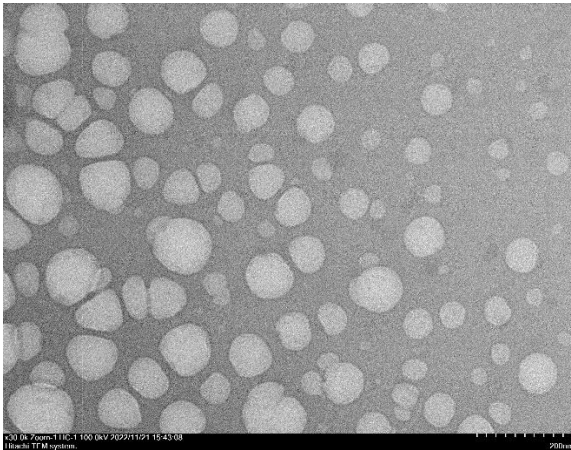
- **JG-2b1, JM-2b1, JE-2b1:** Setelah ekstraksi dasar dengan sentrifusi 10000 xg, 40 mt, supernatan disaring dg 0,45 & 0,22 um. Filtrat di + PEG6000 (1:1/v/v). Inkubasi semalam di kulkas. Esoknya, disentrifusi pada 10000 xg, 30 mt. **Pellet** dilarutkan dalam aquabidest, vortex, lalu disaring lagi dengan 0,22 um. Filtrat terakhir dibawa utk analisis PSA.
- **JG-2b2, JM-2b2, JE-2b2:** Sama dg JG-2b1, JM-2b1, JE-2b1; tetapi esoknya, disentrifusi pada 10000 xg, 30 mt, **supernatan** (masih dalam PEG6000) disaring lagi dengan 0,22 um. Filtrat terakhir dibawa utk analisis PSA.

3. Hasil PSA Agustus 2022:

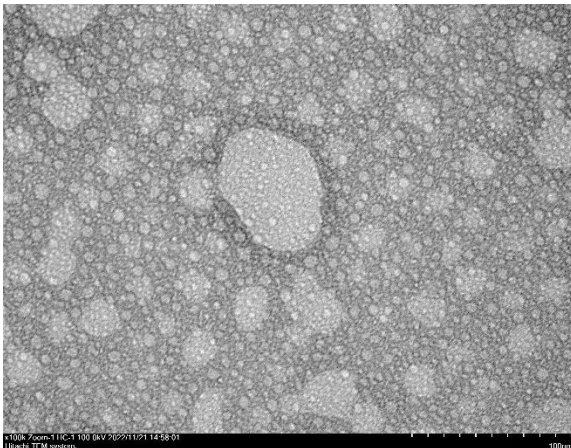
- Pada JG-1 tidak terdeteksi partikel samasekali. Hasilnya kosong untuk ke 3 perlakuan. Prosedur ini tidak menggunakan filter millipore. Padahal, di tahun 2021, kita mendapatkan hasil dari PSA dan TEM. Hal ini belum ditemukan penyebabnya.
- Prosedur untuk JG-2a, JM-2a, JE-2a memberikan hasil paling baik pada batch ini, terutama untuk JG dan JE. Prosedur ini tidak menggunakan PEG6000 sebagai agen pengikat/pengendap partikel. Hasil penyaringan dengan filter millipore 0.45 dan 0.22um dalam aquabidest diduga tidak mendorong fusi antar-partikel.
- Pada JG-2b1 dan JM-2b1 juga tidak didapatkan hasil samasekali. Prosedur ini menggunakan penyaringan dg millipore 0.22 um, sebelum diinkubasi dalam PEG6000 semalam dan setelah disentrifusi keesokannya (pellet dilarutkan dalam aquabidest). Dugaan: masa inkubasi semalam dalam PEG menyebabkan partikel-partikel menyatu menjadi partikel besar, yang tidak dapat melalui pori 0.22 um. Partikel-partikel besar terkumpul pada bagian endapan tersebut. Jadi filtrat tidak mengandung PDEN lagi. Namun, partikel lolos 0.22 um masih ada di JE-2b1, yang kemudian baru menyatu setelah penyaringan tersebut (ukuran partikel yang terukur sudah menjadi besar).
- Pada JG-2b2, JM-2b2, JE-2b2, diperoleh hasil partikel meskipun ukuran reratanya di atas 1000 um, kecuali pada JE-2b2. Diduga bagian supernatan dari sentrifusi terakhir setelah inkubasi semalam, masih mengandung partikel kecil yang lolos penyaringan 0.22 um. Ukuran membesar di waktu selanjutnya sehingga yang terdeteksi partikel yang rata-ratanya besar.

- Diduga kuat, setidaknya PDEN melakukan fusi antar-partikel, beberapa saat setelah diisolasi. Hal itu dinyatakan dengan rerata dan sebaran ukuran partikel yang besar, jauh melebihi ukuran pori millipore 0.22 μm , dan struktur yang terdeteksi dari perekaman partikel di TEM (Gambar di atas).
- PEG6000 bekerja sebagai agen pengendap/pengikat partikel (PDEN), sehingga partikel lebih mudah berfusi satu sama lain. Hasil penelitian Kalarikkal *et al.* (2020) dan Suresh *et al.* (2021) yang mengisolasi PDEN dari rimpang jahe menggunakan PEG6000 melaporkan rerata ukuran partikel yang didapatkan antara 250-900 nanometer.
- Walaupun partikel-partikel tersebut berukuran besar (di atas 1000 nm), setelah melalui penyaringan dengan millipore 0.22 μm , dapat dipastikan partikel tersebut PDEN. Hal itu telah dibuktikan oleh Ibu Dr Anggraini Barlian dengan percobaan internalisasi PDEN jahe Gajah dengan human dermal fibroblast (HDF) dan human Wharton's jelly mesenchymal (hWj MSC) stem cells tahun yang lalu.

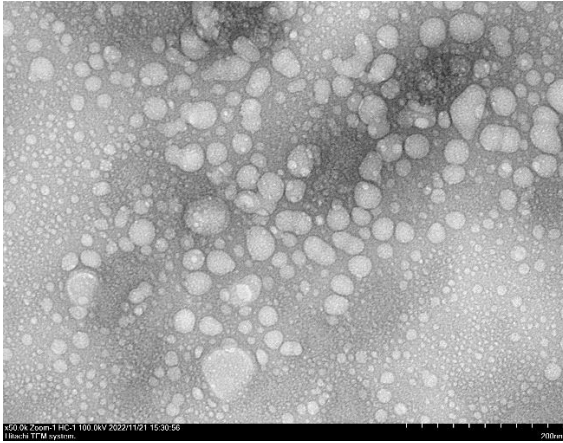
4. Hasil PSA dan TEM November 2022



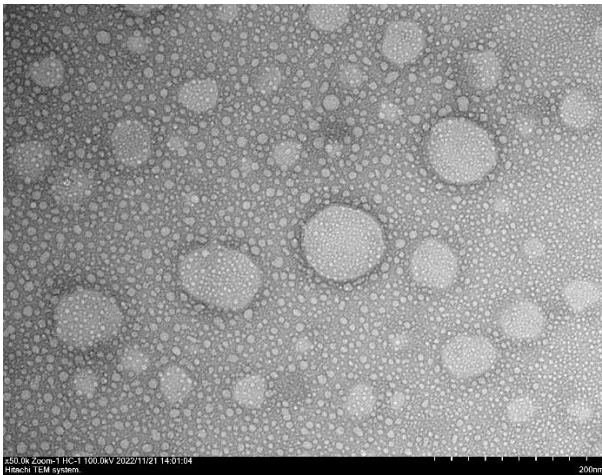
JE diisolasi dengan metode 2a



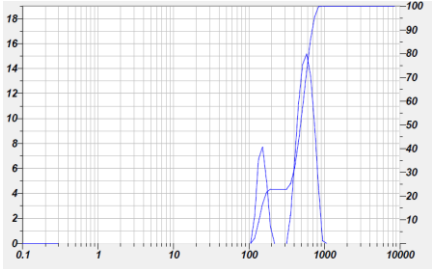
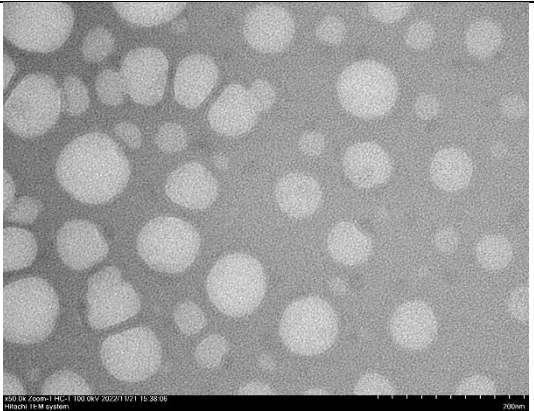
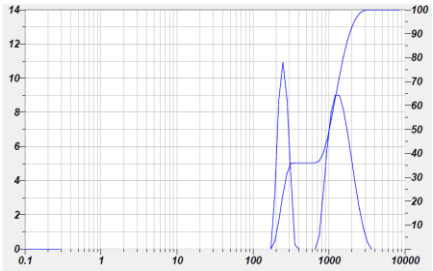
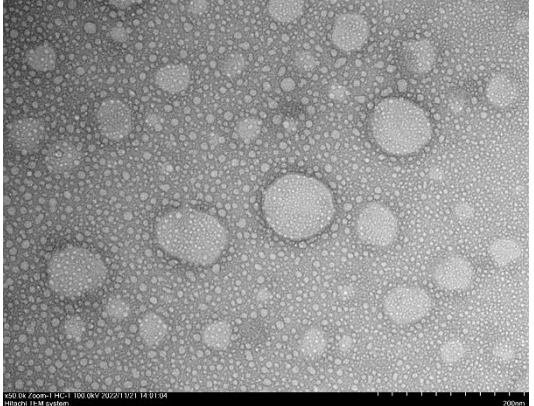
JE diisolasi dg metode 3a-B



JE diisolasi dengan metode 3a-F



JE diisolasi dengan metode 1a –
dengan PEG6000 10%

No	Sampel	PSA	TEM
1	1a (diekstrak dg PEG 10%)	terbentuk 2 peak  dari 3 pembacaan, z average = 332.5667 nm	
2	2a (diekstrak aquabides, disaring dengan filtrasi 0.45 um dan 0.22 um)	terbentuk 2 peak  dari 3 pembacaan, z average = 815.4667 nm	

3	<p>3a 1-B</p> <p>(disaring dengan filtrasi 0.22um dan 0.1 um, bagian bilas)</p>	<p>terbentuk 2 peak (1x) dan 1 peak (2 x) ulangan) dalam 3 replikasi</p> <p>dari 3 pembacaan, z average = 678.5667 nm</p>	
4	<p>3a 2 B</p> <p>(disaring dengan 0.03 um, bagian bilas)</p>	<p>terbentuk 2 peak (2x) dan 1 peak (1x)</p> <p>dari 3 pembacaan, z average = 699.5 nm</p>	
5	<p>3a 1F</p> <p>(disaring dengan filtrasi 0.22um dan 0.1 um, bagian filtrat)</p>	<p>terbentuk 2 peak</p> <p>dari 3 pembacaan, z average = 757.0667 nm</p>	
6	<p>3a 2F</p> <p>(disaring dengan 0.03 um, bagian filtrat)</p>	<p>terbentuk 2 peak</p> <p>dari 3 pembacaan, z average = 665.3667 nm</p>	
7			

Antioxidant capacity

The three varieties of ginger (Gajah, Emprit and Merah)'s PDENs still performed a capacity as antioxidant (Figure 1). Ginger Emprit (JE) presented the highest capacity, followed by Ginger Gajah (JG) and Ginger Merah (JM), when it was expressed in ascorbic acid or Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

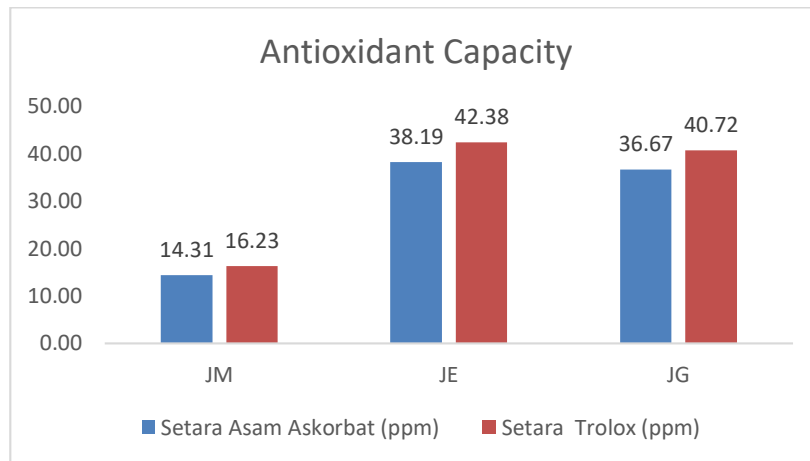
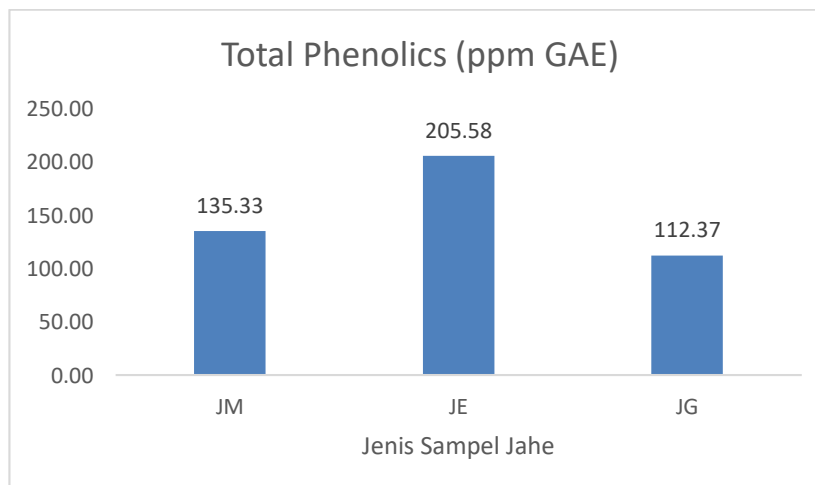


Figure 1. Antioxidant capacity of ginger PDENs, JM (Jahe Merah), JE (Jahe Emprit), JG (Jahe Gajah).

We examined total phenolic content of the ginger PDEN, since phenolics can function as antioxidant too. The results are presented in Figure 2. Again, when it was expressed by gallic acid equivalent, JE demonstrated the most superior than the other varieties of ginger.



These properties will be valuable when the ginger PDENs will be applied as an anti-inflammation agent.

4 KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan:

1. Prosedur isolasi PDEN jahe dapat dilakukan tanpa menggunakan PEG6000, tapi di dalam aquabidest disaring dengan millipore 0.45 lalu 0.22 um.
2. JE memiliki ukuran partikel yang umumnya lebih kecil daripada JG dan JM.
3. Diduga kuat terjadi fusi antar-partikel PDEN di masa penyimpanan di suhu sekitar 4-5 °C.

5 Saran:

1. Bahan hasil isolasi Agustus dapat ditindaklanjuti dengan analisis NTA dan percobaan- percobaan yang ingin dilakukan oleh peneliti ITB. Untuk peneliti UGM, dibutuhkan isolasi lagi.
2. Diharapkan untuk isolasi berikutnya, dapat mulai diuji CD9, CD81 atau marker membran PDEN lainnya.
3. Dapat dimulai upaya untuk mengintroduksi nano-nutrient.

Daftar Pustaka

1. Mingzhen Zhang^{1,2,*}, Emilie Viennois^{1,2}, Meena Prasad^{3,4}, Yunchen Zhang^{1,2}, Lixin Wang^{1,2,3}, Zhan Zhang^{1,2}, Moon Kwon Han^{1,2}, Bo Xiao^{1,2,5}, Changlong Xu^{1,2,6}, Shanthi Srinivasan^{3,4}, and Didier Merlin^{1,2}. *Biomaterials*. 2016 September ; 101: 321–340.
2. Suharta S, Barlian A, Hidajah AC, Notobroto HB, Ana ID, Wungu TDK, Wijaya CH. 2021. *J Food Sci* 86(7): 2838-2850.
3. Javaria Munir, Mihye Lee, and Seongho Ryu (2019) *Exosomes in Food: Health Benefits and Clinical Relevance in Diseases*, *Adv Nutr* 2019;00:1–10; doi: <https://doi.org/10.1093/advances/nmz123>

LUARAN

Tahun Kegiatan : 2022

Luaran yang direncanakan dan capaian tertulis dalam proposal awal:

No	Luaran yang Direncanakan	Capaian (%)
1	Publikasi jurnal internasional minimal Q2	50
2	Publikasi ilmiah internasional terindeks Scopus	100
3	Keterlibatan peneliti ke-4 PT pada publikasi	100

CAPAIAN (Lampirkan bukti-bukti luaran)

PUBLIKASI JURNAL ILMIAH INTERNASIONAL

	Keterangan
ARTIKEL JURNAL KE-1*	
Nama jurnal yang dituju	Int J Mol Sci (Q1, IF 6.208)
Klasifikasi jurnal	Jurnal Internasional
Q1/Q2/Terindeks Scopus	Q1
Judul artikel	PDEN for Biomedical Applications and Regenerative Therapy
Status naskah (diberi tanda ↓)	
- Draf artikel	
- Submitted	

- Under Review	√
- Accepted	
- Published	
ARTIKEL JURNAL KE-2*	
Nama jurnal yang dituju	<i>Hayati Journal of Bioscience</i>
Klasifikasi jurnal	Jurnal Internasional
Q1/Q2/Terindeks Scopus	Q3
Judul artikel	<i>Isolation of Native Plant-Derived Exosome like Nanoparticles and Their Uptake by Human Cells</i>
Status naskah (diberi tanda √)	
- Draf artikel	
- Submitted	
- Under Review	
- Accepted	
- Published	√
ARTIKEL JURNAL KE-3*	
Nama jurnal yang dituju	<i>Hayati Journal of Bioscience</i>
Klasifikasi jurnal	Jurnal Internasional
Q1/Q2/Terindeks Scopus	Q3
Judul artikel	<i>The Properties of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Treated with L-Ascorbic Acid and CoCl₂</i>
Status naskah (diberi tanda √)	
- Draf artikel	
- Submitted	√
- Under Review	
- Accepted	
- Published	
ARTIKEL JURNAL KE-4*	
Nama jurnal yang dituju	Molecules
Klasifikasi jurnal	Jurnal Internasional
Q1/Q2/Terindeks Scopus	Q1
Judul artikel	Anti- microbial and Anti-inflammatory properties of PDEN
Status naskah (diberi tanda √)	
- Draf artikel	√
- Submitted	
- Under Review	
- Accepted	
- Published	
ARTIKEL JURNAL KE-5*	
Nama jurnal yang dituju	FSOA
Klasifikasi jurnal	Jurnal Internasional
Q1/Q2/Terindeks Scopus	Q2
Judul artikel	Anti-inflammatory Potency of Plant-derived exosomes-like nanoparticles from Ginger on RAW 264.7 Cell Line Induced by Lipopolysaccharide
Status naskah (diberi tanda √)	
- Draf artikel	√
- Submitted	
- Under Review	
- Accepted	
- Published	

* Jika masih ada artikel ke-2 dan seterusnya, uraikan pada lembar tambahan

3. KETERLIBATAN PENELITI KE-4 PT PADA PUBLIKASI

ARTIKEL ILMIAH 1	Main draft dibuat oleh tim dari UGM, kemudian di review oleh peneliti partner sebelum dilakukan proses submission, sehingga nama keempat peneliti partner juga kami cantumkan sebagai co-author. Saat ini artikel telah submit dan dalam proses review (Q1).
------------------	--

ARTIKEL ILMIAH 2	Semua peneliti terlibat pada proses diskusi maupun penyusunan artikel ilmiah.
ARTIKEL ILMIAH 3	Semua peneliti terlibat pada proses diskusi maupun penyusunan artikel ilmiah.
ARTIKEL ILMIAH 4	Main draft sedang ditulis oleh peneliti UGM. Masih dalam taraf penulisan untuk disubmit ke Molecules (Q1).
ARTIKEL ILMIAH 5	Main draft sedang ditulis oleh para peneliti. Masih dalam taraf penulisan untuk disubmit ke Molecules (Q2).

Jika luaran yang direncanakan tidak tercapai, uraikan alasannya:

Luaran sedang dalam proses persiapan dan penyusunan berdasarkan data yang didapatkan.

LUARAN TAMBAHAN

1. Kesempatan lulusan untuk melanjutkan studi dan memperoleh beasiswa ke PT-MITRA LN
2. Bantuan mikrofilter dari dari PT MITRA-LN

Lampiran.

LOGBOOK ISOLASI PDEN 2022

NO	TANGGAL	EKSTRAKSI	PRESIPITASI	HASIL
1	06/06/2022	Rhizome 3 jenis jahe (3 g): <ul style="list-style-type: none"> • Saringan nilon 40 um • Sentrifusi 2000 xg-10 mt • Sentrifusi 6000xg-20 mt • Sentrifusi 10000 xg-40 mt • Millipore 0.45 um • Millipore 0.22 um 	PEG6000 10% Overnight, 4 °C Sentrifusi 8000 xg-30 mt	Struktur pecah, tidak beraturan. Tidak membulat
2	13/07/2022	Rhizome jahe Gajah: <ul style="list-style-type: none"> • Saringan nilon 40 um • Sentrifusi 2000 xg-10 mt • Sentrifusi 6000xg-20 mt • Sentrifusi 10000 xg-40 mt • Millipore 0.45 um (Prosedur B) • + Millipore 0.22 um (Prosedur A) 	PEG6000 10% Overnight, 4 °C Sentrifusi 8000 xg-30 mt ATAU 10000 xg-30 mt	Hasil: Ukuran PDEN masih besar (> 1000 nm). Tanpa TEM
3	03/08/2022	3 jenis jahe: Pros. 2.a. <ul style="list-style-type: none"> • Saringan nilon 40 um • Sentrifusi 2000 xg-10 mt • Sentrifusi 6000xg-20 mt • Sentrifusi 10000 xg-40 mt 	Supernatan difilter 0.45 µm lalu 0.22 µm dlm aquabidest. Filtrat disimpan semalam di 4 °C	Hasil sekitar 120-150 nm (JM 400-700 nm). JG tdk ada hasil. Ada hasil protein & internalisasi (ITB). Tanpa TEM
	03/08/2022	3 jenis jahe: Pros. 2.b <ul style="list-style-type: none"> • Saringan nilon 40 um • Sentrifusi 2000 xg-10 mt • Sentrifusi 6000xg-20 mt • Sentrifusi 10000 xg-40 mt 	Supernatan difilter 0.45 µm lalu 0.22 µm. Filtrat + PEG6000 10% (1:1). Inkubasi overnight at 4 °C. Besoknya: Vortex, sentrifusi 10000 xg-30 mt. 2.b.1: Pelet + aquabides, lalu 0.22 µm. 2.b.2: Supernatan disaring 0.22 µm.	JG-2b1: no result detected JM-2b1: no result detected JE-2b1: 4470.6 nm - 3834.77 nm JG-2b2: 2630.5 nm - 4542,38 nm JM-2b2: 1189,87 nm - 1466,98 nm JE-2b2: 44,57 nm - 97,05 nm
4	14/09/2022	Ulangi Pros 2a tanpa PEG (dg akuabides), untuk ke 3 jenis jahe. Uji	Supernatan difilter (Jepang) 0.45 µm	Hasil bilasan (B) tidak ada hasil

		antioksidan dengan khamir, DPPH (as askorbat & trolox), uji kandungan fenol.	lalu 0.22 μm , 0.03 μm , dengan vacuum pump.	PSA, Filtrat dari 0.03 μm berukuran 100-700 nm. Terbaik JE-F =198 nm. TEM: banyak partikel seperti pecah.
5	10/11/2022	Isolasi JG, JM, JE dg metode awal, tanpa millipore, tanpa PEG (Pros. 2.a)		PDEN untuk ibu Ika
6	16/11/2022	Isolasi JE saja dg cara awal, sampai sentrifugasi 10000 xg 40mt. - Lalu saring dg millipore biasa pd 0.45 dan 0.22 um. - Lalu disaring dg millipore jepang, 0.22 & 0.1 um. - Setelah dari 0.1 um, disaring lagi dg 0.03 um.	PEG 10% semalam. Sentrifugasi esoknya pd 8000xg 30mt Simpan dlm aquabidest semlm di kulkas. Dipisahkan filtrat (F) & bilasan dr filter (B). Aquabidest (Aq) Dipisahkan filtrat (F) & bilasan dr filter (B). (Aq).	Cara 1. Hasil: TEM & PSA Tgl 23 Nov'22 Cara 2.a Cara 3a.1 (F) & 3a.1 (B). Cara 3a.2 (F) & 3a.2 (B).