

**PENGARUH SECRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL
STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI MITF DAN TRP-1/2
TIKUS MODEL HYPERPIGMENTASI
(Studi eksperimental tikus jantan galur wistar yang dipapar
sinar UV-B)**

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister S2



Disusun Oleh:
Zaharah Kurniawati
MBK 2015010190

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2021**

TESIS

**PENGARUH SECRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELLS
TERHADAP EKSPRESI MITF DAN TRP-1/2 TIKUS MODEL
HYPERPIGMENTASI**
(Studi eksperimental tikus jantan galur wistar yang dipapar sinar UV-B)

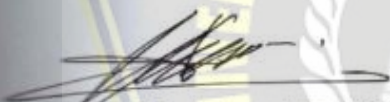
Disusun oleh
Zaharah Kurniawati
MBK 2015010190

akan dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada tanggal 21 Februari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk di terima

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II


Asst. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210 199 050


Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes.
NIK. 220 198 045

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


Asst. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210 199 050

PERNYATAAN

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

Semarang, Januari 2022



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Zaharah Kurniawati
Tempat, tanggal lahir : Pati, 05 Mei 1974
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Kebowan : lulus tahun 1986
2. SMPN 01 Winong : lulus tahun 1989
3. SMA Nasional : lulus tahun 1992
4. FK UNISSULA : lulus tahun 2002
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2019 – sekarang)

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2003-2007 : RS. Panti Rukmi
2. Tahun 2010-Sekarang : PKM 2 Winong
3. Tahun 2012-Sekarang : Klinik Zahara Medica
4. Tahun 2016-Sekarang : Klinik Zhara Medica II

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : M.S. Hartono
Ibu : Sri Wahyuni
2. Nama Suami : Bambang Supriyono
3. Nama Anak : Muhammad Aljendra Mushafiro

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan atas berkat-Nya, sehingga proposal tesis dengan judul, **“Pengaruh Secretom Hipoksia *Mesenchymal Stem Cells* Terhadap Ekspresi MITF Dan TRP-1/2 Tikus Model Hyperpigmentasi”**. (Studi In Vivo Pada Tikus Galur Wistar Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar Sinar UVB) ini dapat terselesaikan. Proposal tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam- dalamnya kepada:

1. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Pembimbing I yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.
3. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK(K); Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF; Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen penguji I, II dan III yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini lebih baik.

5. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
6. Suami tercinta Bambang Supriyon yang selalu rela mengantar pati ke semarang demi istrinya yang minta ditemani karena urusan kampus. Terimakasih untuk selalu ada dan mendukung disaat saya butuhkan. Serta anak kebanggaan Mimi: Muhammad Aljendra Mushafiru; karena mu Nak, mimimu bisa berjuang sejauh ini... Semoga kelak kamu bisa meraih cita- cita lebih dari yang Mimi sudah capai saat ini.
7. Seluruh keluarga besar Puskesmas Winong 2 yang selalu menyemangati dan selalu memberikan izin tiap kali bimbingan ke semarang... Terimakasih atas dukungan kalian.
8. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Research) Fakultas Kedokteran Unissula: Devi, Dina, Ariq, Ardi, Chandra, Ifan, Dayat, Santi, dan Nurul, dan Topik, kalian sudah seperti keluarga kedua saya... Terimakasih anak- anak asuh, akhirnya saya bisa mengakhiri pertandingan ini dengan baik berkat kalian.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, Februari 2022



Zaharah Kurniawati



ABSTRAK

PENGARUH SECRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI MITF DAN TRP-1/2 TIKUS MODEL HYPERPIGMENTASI

Latar belakang: Radiasi UVB merupakan faktor utama penyebab hiperpigmentasi. Sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (S-HMSCs) mengandung *soluble molecule* bioaktif seperti *growth factor* dan sitokin anti-inflamasi yang mampu mencegah sintesis melanin dan menginduksi pembentukan kolagen. Namun, peran S-HMSCs terhadap ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-2 pada pembentukan melanin hingga saat ini masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian S-HMSCs dalam bentuk sediaan gel terhadap ekspresi MITF, TRP-1, dan TRP-2 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.

Metode: Penelitian eksperimental dengan *post test control group*. Kelompok Sham, kontrol positif, kontrol basis gel, S-HMSCs 100 μ L dan S-HMSCs 200 μ L masing-masing dipapar UVB selama 6 kali dalam 14 hari dengan 302 nm dengan MED 390 mJ/cm², sedangkan sham tidak menerima paparan UVB. pada S-HMSCs 100 μ L diberi gel S-HMSCs 100 μ L dan S-HMSCs 200 μ L diberi gel S-HMSCs 200 μ L setiap hari selama 14 hari, sedangkan kontrol basis gel menerima base gel. Pada hari ke 14 dilakukan terminasi dan dianalisis ekspresi MITF, TRP-1, dan TRP-2 menggunakan qRT-PCR.

Hasil: Analisa ekspresi gen MITF (1.96 ± 0.56), TRP-1 (1.96 ± 0.56), dan TRP-2 (1.51 ± 0.34) pada kelompok perlakuan S-HMSCs 200 μ L mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi dibandingkan dengan kelompok kontrol MITF (8.26 ± 0.68), TRP-1 (49.36 ± 6.49), dan TRP-2 (5.48 ± 1.04).

Kesimpulan: Pemberian gel S-HMSCs diharapkan berpengaruh secara bermakna terhadap kecepatan penurunan proses hiperpigmentasi.

Kata Kunci: MITF, TRP-1, TRP-2, S-HMSCs, hiperpigmentasi

ABSTRACT

THE EFFECT OF HYPOXIC SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELLS ON MITF AND TRP-1/2 EXPRESSION IN HYPERPIGMENTED RAT MODEL

Background: UVB radiation is the main factor causing hyperpigmentation. Secretome hypoxic mesenchymal stem cells (S-HMSCs) contain bioactive soluble molecules such as growth factors and anti-inflammatory cytokines that can prevent melanin synthesis and induce collagen formation. However, the role of S-HMSCs on MITF, TRP-1, and TRP-2 gene expression in melanin formation is still unclear. This study aimed to determine the effect of administration of S-HMSCs gel on the expression of MITF, TRP-1, and TRP-2 in a hyperpigmented rat skin model induced by UVB light exposure.

Methods: Experimental research with post test control group. The UV-, UV+, UVG, UV100 and UV200 groups were exposed to UVB 6 times in 14 days at 302 nm with a MED of 390 mJ/cm², while UV- did not receive UVB exposure. UV100 was given 100 L of S-HMSCs gel, and UV200 was given 200 L of S-HMSCs gel every day for 14 days, while UVG received base gel. On the 14th day, MITF, TRP-1, and TRP-2 were terminated and analyzed using qRT-PCR.

Results: Analysis of (1.96±0.56), TRP-1 (1.96±0.56), and TRP-2 (1.51±0.34) gene expression in the treatment group decreased along with the increase in the concentration of S-HMSCs 200µL compared to the control group MITF (8.26±0.68), TRP-1 (49.36±6.49), and TRP-2 (5.48±1.04).

Conclusion: The administration of S-HMSCs gel is expected to affect the speed of decreasing the hyperpigmentation process significantly.

Keywords: MITF, TRP-1, TRP-2, S-HMSCs, hyperpigmentation

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
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
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.5.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. MITF.....	9
2.1.1. Definisi	9
2.1.2. Peran MITF dalam Hiperpigmentasi.....	9
2.2. TRP.....	11
2.2.1. Definisi	11
2.2.2. Peran TRP dalam Hiperpigmentasi.....	11
2.3. Hiperpigmentasi	15
2.3.1. Definisi	15
2.3.2. Proses Hiperpigmentasi.....	15
2.4. Melanin.....	16

2.4.1.	Definisi.....	16
2.4.2.	Mekanisme Sintesis Melanin	17
2.5.	Mesenchymal Stem Cells	19
2.5.1.	Definisi.....	19
2.5.2.	Sumber MSCs	19
2.5.3.	Karakteristik MSCs.....	20
2.5.1.	Peran MSCs.....	21
2.6.	Hipoksia.....	21
2.7.	Secretom MSCs.....	22
2.8.	Sediaan Gel.....	23
2.9.	Farmakokinetik Obat Topikal.....	26
2.8.1.	Jalur Penetrasi Sediaan Topikal	27
2.8.2.	Absorpsi Sediaan Topikal secara Umum	28
2.10.	Peran dan Mekanisme Faktor Inflamasi pada Regulasi Melanogenesis.....	29
2.11.	Pengaruh MSCs terhadap Ekspresi Gen MITF dan TRP1/2	29
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		30
3.1.	Kerangka Teori.....	30
3.2.	Kerangka Konsep	32
3.3.	Hipotesis.....	32
BAB IV METODE PENELITIAN		33
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	33
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	34
4.2.1.	Variabel Peneltian	34
4.2.2.	Defenisi Operasional.....	34
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	36
4.3.1.	Subyek Penelitian.....	36
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	37
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	37
4.3.4.	Besar Sampel.....	38
4.4.	Alat dan Bahan	38

4.4.1. Alat.....	38
4.4.2. Bahan.....	39
4.5. Cara Penelitian.....	39
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	39
4.5.2. Prosedur Isolasi MSCs	39
4.5.3. Pembacaan CD90, CD29, CD45 dan CD31.....	40
4.5.4. Proses Hipoksia	41
4.5.5. Pembuatan Sediaan Gel.....	42
4.5.6. Pembuatan Photoaging dan Perlakuan	42
4.5.7. Terminasi dan Pengambilan Jaringan	43
4.5.8. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA.....	43
4.5.9. Pembacaan MITF dan TRP1/2 qRT-PCR.....	45
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian.....	46
4.6.1. Tempat Penelitian.....	46
4.6.2. Waktu Penelitian	46
4.7. Analisa Data	46
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	54
5.1. Hasil Penelitian.....	54
5.2. Pembahasan	66
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	72
6.1. Kesimpulan.....	72
6.2. Saran.....	72
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN	88

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 2.1. Fungsi dan Mekanisme Faktor Inflamasi pada Regulasi Melanogenesis	18
Tabel 4.1. Reagen yang Digunakan dalam <i>Flow Cytometry</i>	41
Tabel 5.1. Data hasil penelitian ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-1	57
Tabel 5.2. Uji post-hoc LSD ekspresi mRNA MITF	60
Tabel 5.3. Uji post-hoc LSD ekspresi mRNA TRP-1	63
Tabel 5.4. Uji post-hoc LSD ekspresi mRNA TRP-2	66



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Skema Degradasi kolagen Akibat Paparan Sinar UVB	10
Gambar 2.2. Skema Kaskade Trasduksi Sinyal Melanogenesis	12
Gambar 2.3. Peran Sitokin dalam Menghambat dan Menstimulasi melanin	17
Gambar 2.4. Sumber Mesenchymal Stem Cells.....	20
Gambar 2.5. Kemampuan Diferensiasi dari MSCs	20
Gambar 2.6. Lingkungan Hipoksia Mengaktivasi MSCs	22
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	31
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	32
Gambar 4.1. Gambar Rancangan Penelitian	33
Gambar 4.2. Alur Penelitian.....	48
Gambar 5.1. Isolasi MSCs dengan konfluen 80%	55
Gambar 5.2. Analisis Flow cytometry ekspresi CD90, Cd29, CD45, dan CD31 .	56
Gambar 5.3. Konsentrasi sitokin IL-10 dan growth factor TGF-B.....	57
Gambar 5.4. Morfologi Melanin Kulit Hewan Model	58
Gambar 5.5. Hasil RT-PCR eskpresi mRNA MITF	59
Gambar 5.6. Hasil RT-PCR eskpresi mRNA TRP-1	62
Gambar 5.7. Hasil RT-PCR eskpresi mRNA TRP-2	64

DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte Colony-stimulating Factor</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
GM-SCF	: <i>Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
HE	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
hMSCS	: <i>Human Mesenchymal Stem Cell</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
S-HMSCs	: <i>Hypoxia Preconditioned Medium Mesenchymal Stem Cell</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
kDa	: <i>Kiolodaltons</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>

L-DOPA	: L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v
MAPK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinases v</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MITF	: <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor v</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
MSCS	: <i>Mesenchymal stem cell v</i>
S-HMSCs	: <i>Secretom Mesenchymal stem cell</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PBS	: <i>Phospat Buffer Saline</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1 v</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-β1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radiasi sinar ultraviolet B (UVB) merupakan faktor utama penyebab hiperpigmentasi dan terhentinya sintesis kolagen yang berdampak terhadap pembentukan pigmen berwarna hitam dan *wrinkle* pada kulit akibat meningkatnya jumlah melanin¹. Gen yang terlibat dalam proses hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB, diantaranya *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) yang merupakan faktor utama untuk regulasi melanogenesis dan fungsi melanosit^{2,3}. MITF juga mengatur ekspresi enzim melanogenik termasuk *tyrosinase-related protein 1/2* (TRP-1/2). TRP-1/2 mengkatalis hidrosilasi tirosin menjadi 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) dan oksidasi DOPA menjadi dopakuinon yang akhirnya akan membentuk eumelanin dan pheomelanin⁴. Selain gen, beberapa sitokin seperti interleukin-10 (IL-10) dan *transforming growth factor-β* (TGF-β) pada secretom *mesenchymal stem cells* (MSCs) secara langsung atau tidak langsung juga mengatur proliferasi, diferensiasi dan melanogenesis pada melanosit epidermal⁵. Mekanisme yang mendasari aktivitas secretom tersebut terhadap hiperpigmentasi hingga saat ini masih belum jelas.

Pencegahan hiperpigmentasi dengan beberapa agen kimiawi seperti arbutin⁶, asam azelaic⁷, asam kojic, dan hidrokuinon⁸ dilaporkan menimbulkan efek samping yang merugikan seperti genotoksisitas⁹, iritasi kulit⁸, dermatitis kontak¹⁰, dan kanker kulit⁸. Pada tahun 2015 sebanyak 4.2%

dari 142 subjek positif mengalami hiperpigmentasi setelah terpapar tiga kali *minimal erythema dose* (MED) UVB¹¹. Kasus hiperpigmentasi di Indonesia mencapai 0.25-4% dari seluruh kasus penyakit kulit¹². Keseluruhan kasus hiperpigmentasi ini, 8% diantaranya menyebabkan karsinoma skuamosa yang dikenal dengan kanker kulit melanoma dengan potensi metastasis tinggi^{13,14}.

S-HMSCs mengandung berbagai komponen yang dilepaskan oleh MSCs yang terdiri atas kemokin, faktor pertumbuhan dan sitokin inflamasi seperti IL-10 dan *growth factor* yang terdiri dari *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platet Derived Growth Factor* (PDGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) dan TGF- β ^{15,16}. Beberapa *soluble molecule* yang di sekresikan sekretom termasuk IL-10 dan TGF- β diduga mampu mengendalikan kerusakan kulit akibat radiasi sinar UVB dengan merangsang *fibroblast* menghasilkan kolagen^{17,18}, menghambat pembentukan melanin dan menurunkan inflamasi^{19,20}. Hasil penelitian melaporkan bahwa hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB diatur oleh gen, protein dan enzim, yaitu tyrosinase, MITF, TRP-1 dan TRP-2^{2,3}. Dalam jalur produksi melanin, paparan sinar UVB berlebihan memicu tyrosinase yang bertanggung jawab dalam hidroksilasi L-tyrosine menjadi L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). L-DOPA selanjutnya dioksidasi menjadi L-DOPAkuinon untuk dibentuk menjadi eumelanin dan pheomelanin⁴.

Senyawa IL-10 dapat mencegah aktivasi MITF dan menginduksi pembentukan kolagen pada sel melanoma⁵. Hiperpigmentasi berdasarkan jalur MITF tersebut dapat di cegah dan di perbaiki dengan pemberian

sekretom yang mengandung berbagai sitokin dan *growth factor*. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa TGF- β mampu menghambat ekspresi MITF melalui penekanan aktivitas protein kinase A sehingga menurunkan produksi protein MITF, tirosinasi, TRP-1 dan TRP-2^{21,22}. *Growth factor* pada S-HMSCs seperti HGF terbukti menginduksi aktivasi jalur PI3K/Akt yang akhirnya meninhibisi aktivasi MITF pada sel melanoma²³. Disisi lain sitokin TNF dan IL-10 dapat mencegah melanogenesis melalui penghambatan jalur MAPK sehingga menurunkan ekspresi enzim tyrosinase, TRP-1, dan TRP-2²⁴. Mekanisme molekuler yang mendasari aktivitas S-HMSCs terhadap ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-2 pada hiperpigmentasi kulit hingga saat ini masih belum jelas.

Keunggulan pemberian S-HMSCs dibanding dengan senyawa lain diantaranya adalah S-HMSCs merupakan bio molekul aktif sehingga tidak memiliki imunogenisitas, tidak menimbulkan efek samping dan ukuran molekulnya yang kecil sangat mudah untuk diabsorpsi menembus barrier kulit menuju dermis. Hal tersebut mendukung hasil penelitian terdahulu bahwa S-HMSCs sebagai alat terapeutik baru untuk pengobatan hiperpigmentasi²². Oleh karena itu, memungkinkan adanya potensi S-HMSCs sebagai agen alternatif untuk mencegah hiperpigmentasi pada kulit akibat paparan sinar UVB. Maka, dalam penelitian ini akan diinvestigasi pengaruh S-HMSCs pada konsentrasi 100 μ l dan 200 μ l terhadap ekspresi MITF, TRP-1, dan TRP-2 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi iradiasi UVB secara *in vivo*.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah:
"Apakah terdapat pengaruh S-HMSCs terhadap ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-2 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB?"

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh S-HMSCs terhadap ekspresi gen MITF, ekspresi gen TRP-1, dan ekspresi gen TRP-2 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh penurunan ekspresi gen MITF pada kulit tikus model hiperpigmentasi diinduksi paparan sinar UVB setelah pemberian S-HMSCs pada dosis (P1) 100 µl dan (P2) 200 µl dibandingkan dengan kontrol.
2. Untuk mengetahui pengaruh penurunan ekspresi gen TRP-1 pada kulit tikus model hiperpigmentasi diinduksi paparan sinar UVB setelah pemberian S-HMSCs pada dosis (P1) 100 µl dan (P2) 200 µl dibandingkan dengan kontrol.
3. Untuk mengetahui pengaruh penurunan ekspresi gen TRP-2 pada kulit tikus model hiperpigmentasi diinduksi paparan sinar UVB

setelah pemberian S-HMSCs pada dosis (P1) 100 µl dan (P2) 200 µl dibandingkan dengan kontrol.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian gel S-HMSCs dalam dunia kedokteran sebagai agen regeneratif yang berpengaruh terhadap regenerasi/ perbaikan kulit akibat paparan sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat mengungkapkan peran gel S-HMSCs dalam regenerasi/ perbaikan kulit dan pencegah hiperpigmentasi yang efektif. Selain itu penelitian ini dapat memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh gel S-HMSCs terhadap perbaikan/regenerasi kulit. Penelitian lebih lanjut dapat di aplikasikan bagi masyarakat.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian (2018-2021)

Peneliti,Tahun	Judul	Metode	Hasil
Se-Ra Park, Jae-Wan Kim, Hee-Sook Jun, Yoo Young Roh, Hwa-Yong Lee,	Stem Cell Sekretom and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing	In Vitro, Eksperiment al	Sekretom meningkatkan kemampuan proliferasi sel kulit seperti

In-Sun Hong, 2017 ²⁵			fibroblast, keratinosit, dan epitel vascular, meningkatkan perbaikan kulit
Anny Waloski Robert, Felipe Azevedo Gomes, Michele Patricia Rode, Maira Marques da Silva, Maria Beatriz da Rocha Veleirinho, Marcelo Maraschin, Leila Hayashi, Giordano Wosgrau Calloni, 2019 ²⁶	The skin regeneration potential of a pro- angiogenic sekretom from human skin- derived multipotent stromal cells	In Vivo, Eksperiment al, topikal	Hidrogel poli alcohol mengandung sekretom meningkatkan angiogenesis
Marie-Jeanne Pierrat, Veronique Marsaud, Alain MaUVBiel, and Delphine Javelud, 2012 ²²	Expression of Microphthalmia- associated Transcription Factor (MITF), Which Is Critical for Melanoma Progression, Is Inhibited by Both Transcription Factor GLI2 and Transforming Growth Factor- β	In Vitro, Eksperiment al,	TGF- β menghambat ekspresi MITF, menghambat perkembangan melanoma
Sudha Balasubramania n, Chara Thej, Ankita Wavekar,	Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of	In Vitro, eksperiment al	<i>Conditional medium</i> MSCS/ sekretom menghambat

Priyanka Swamynathan, Pawan K Gupta, Raviraja N Seetharam, Anish S Majumdar, 2017 ²⁷	Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation		aktivasi Extra Cellular Matrix (ECM)/MMP sehingga terjadi sintesis kolagen.
Natalia Basalova, Georgy Sagaradze, Mikhail Abartskiy, Evgeniy Evtushenko, Natalia Kalinina, 2019 ²⁸	Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles	In vitro Eksperimental,	Secrektom MSCS mencegah diferensiasi miofibroblas dan pembentukan ECM yang dapat menyebabkan turunnya produksi kolagen.
Vivi Yustianingsih, Titiek Sumarawati, Agung Putra, 2019 ²⁹	Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells	In Vitro, Eksperimental	Hipoksia MSCS meningkatkan proliferasi dan stemness MSCS, serta sitokin lebih optimal.

Penelitian sudha *et al.*, 2017 menggunakan *Conditional medium* MSCs tanpa filtrasi untuk meningkatkan sintesis kolagen²⁷. Penelitian basalova *et al.*, 2017 menggunakan secrektom MSCs untuk mencegah diferensiasi miofibroblas dan pembentukan ECM sehingga menginduksi pembentukan kolagen pada sel fibroblast secara in vitro. Penelitian yustianingsih *et al.*, 2019 mengungkapkan kondisi hipoksia MSCs meningkatkan produksi sitokin yang disekresikan MSCs. Penelitian Robert

et al., 2019 menggunakan *hydrogel poli alcohol* yang mengandung sekretom untuk meningkatkan angiogenesis. Penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena dengan menggunakan sekretom hipoksik MSCs yang di filtrasi dengan *tangential flow filtration* (TFF) sehingga diperoleh sekretom dengan ukuran dan kandungan tertentu, pada penelitian ini pemberian sekretom di berikan secara topikal dalam bentuk sediaan gel, dibandingkan pada kontrol dengan mengukur ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-2.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)*

2.1.1. Definisi

MITF dikenal sebagai protein helix-loop-helix dasar kelas E 32 atau bHLHe32 adalah protein yang pada manusia dikodekan oleh gen MITF. MITF adalah faktor transkripsi ritsleting heliks-loop-helix dasar yang terlibat dalam regulasi jalur spesifik garis keturunan dari banyak jenis sel termasuk melanosit, osteoklas, dan sel mast. MITF mungkin terlibat dalam kaskade pensinyalan yang secara khusus diperlukan untuk kelangsungan hidup dan fungsi fisiologis prekursor sel normal melanosit³⁰.

2.1.2. Peran MITF dalam hiperpigmentasi

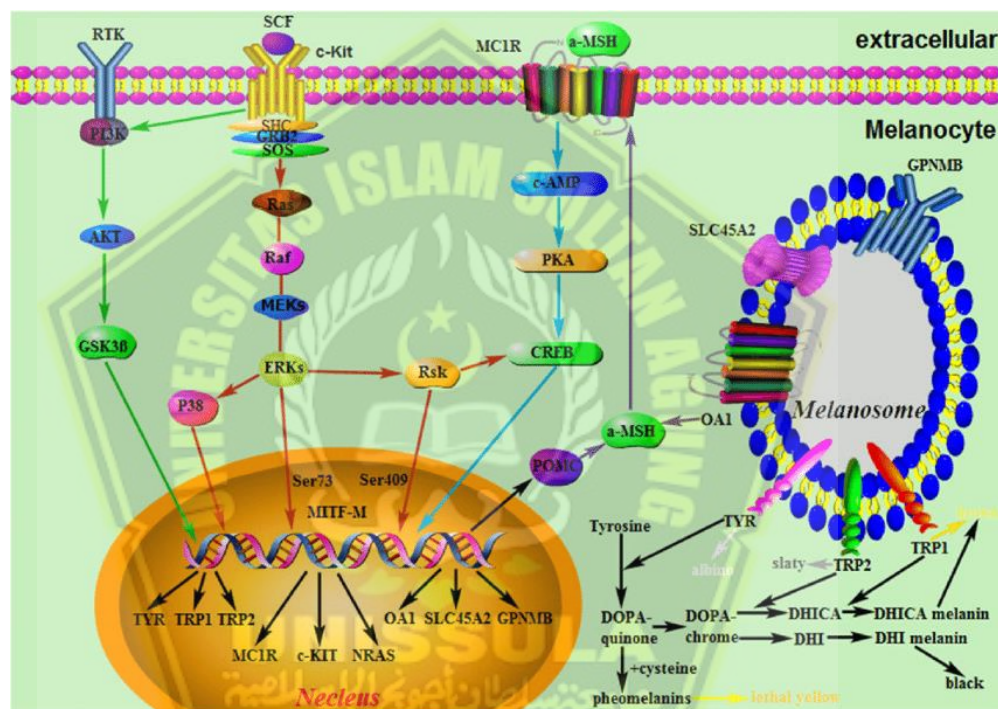
MITF, bersama dengan faktor transkripsi EB (TFEB), TFE3 dan TFEC, termasuk dalam subfamili protein bHLHZip terkait, yang disebut keluarga faktor transkripsi MiT-TFE. Faktor-faktor tersebut mampu membentuk homo dan heterodimer pengikat DNA yang stabil. Target protumorigeniknya meliputi faktor-faktor yang terlibat dalam kematian sel, replikasi DNA, perbaikan, mitosis, produksi microRNA, *membrane trade*, dan metabolisme mitokondria³¹. Mutasi gen ini menyebabkan ketulian, pengeroposan tulang, mata kecil, dan mata serta kulit berpigmen buruk. Pada subjek manusia, karena diketahui bahwa MITF mengontrol ekspresi berbagai gen yang penting untuk sintesis melanin normal dalam melanosit, mutasi

MITF dapat menyebabkan penyakit seperti melanoma, sindrom Waardenburg, dan sindrom Tietz²³.

Mekanisme biokimia hiperpigmentasi yaitu: 1) tingkat methylcobalamin yang rendah dalam melanosit menyebabkan penurunan tingkat glutathione tereduksi (GSSH); yang pada gilirannya mengaktifkan enzim tirosinase dalam jalur sintesis melanin, 2) sintesis DNA yang rusak mengaktifkan faktor transkripsi terkait Microphthalmia (MITF); yang menyebabkan aktivasi dari tirosinase dan protein terkait tirosinase 1 dan 2 (TRP 1 dan 2)³². 3) hiperhomosisteinemia menyebabkan akumulasi sistein yang menyebabkan peningkatan sintesis melanin, 4) cacat transfer melanin dari melanosit ke keratinosit megaloblastik yang berdekatan. Peningkatan angiogenesis sekunder untuk upregulasi dermal vascular endothelial growth factor (VEGF) juga dapat menyebabkan peningkatan pigmentasi. Baik studi histopatologi dan ultrastruktural telah mendalilkan bahwa hiperpigmentasi disebabkan oleh peningkatan jumlah melanosit basal serta peningkatan melanosom³³.

Biosintesis melanin diprakarsai oleh beberapa rangsangan termasuk iradiasi UV, sitokin inflamasi, dan sinyal hormonal. Secara khusus, α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) yang dilepaskan dari keratinosit yang terpapar sinar UV dapat merangsang biosintesis melanin di epidermalmelanosit dengan mengaktifkan sumbu cAMP-PKA-CREB (cyclic adenosine monophosphate-protein kinaseA-cAMP response element binding protein)³⁴. Sumbu cAMP-PKA-CREB yang diaktifkan menyebabkan

peningkatan mRNA yang mengkode faktor transkripsi terkait mikrophthalmia (MITF). MITF meningkatkan ekspresi gen tirosinase (TYR), *tyrosinase-related protein 1* (TYRP1), dan *tyrosinase-related protein 2* (TYRP2) pada stimulasi α -MSH di melanosit³⁵. Selain itu, banyak jalur pensinyalan yang mengontrol pertumbuhan sel, termasuk mitogen-activated protein kinase (MAPKs), ekstraseluler response kinase (ERK), dan AKT, sangat penting untuk melanogenesis dengan mengatur stabilitas dan aktivitas MITF.



Gambar 2.1. Jalur pensinyalan di mana MITF-M mengatur melanogenesis dalam melanosit³⁴

Enzim tirosinase, tembaga multifungsi -mengandung oksidase, berperan penting dalam biosintesis melanin dengan mengkatalisis reaksi di mana L-tirosin dihidroksilasi menjadi L-dihidrosifenilalanin (L-DOPA) dan L-DOPA dioksidasi menjadi o-kuinon (dopakuinon)⁴. Oleh karena itu,

beberapa inhibitor tirosinase juga menghambat biosintesis melanin, dan ini termasuk resveratrol, arbutin, dan hinokitiol, yang semuanya telah digunakan dalam aplikasi kosmetik pemutih kulit.

2.2. *Tyrosinase-related protein (TRP)*

2.2.1. Definisi

Enzim TRP dibagi menjadi 2 sub family TRP-1 dan TRP-2. Protein TRP1, adalah enzim yang pada manusia dikodekan oleh gen TRP1 atau *Tyrp1*. TRP1 adalah produk gen spesifik melanosit yang terlibat dalam sintesis melanin. Sementara sebagian besar TRP1 memiliki aktivitas dihydroxyindole carboxylic acid oxidase, fungsi dalam melanosit manusia kurang jelas. Selain perannya dalam sintesis melanin, TRP1 terlibat dalam menstabilkan protein tirosinase dan memodulasi aktivitas katalitiknya. TRP1 juga terlibat dalam pemeliharaan struktur melanosom dan mempengaruhi proliferasi melanosit dan kematian sel melanosit ³⁶. Dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, TRP 2), juga dikenal sebagai DCT, adalah gen manusia. Ekspresinya diatur oleh faktor transkripsi terkait mikroftalmia (MITF) ³⁷.

2.2.2. Peran TRP1/2 pada Hiperpigmentasi

TRP merupakan enzim pembatas laju untuk mengendalikan produksi melanin terutama terlibat dalam dua reaksi yang berbeda dari sintesis melanin: (1) hidroksilasi monofenol, dan (2) konversi o-difenol menjadi o-kuinon yang sesuai. o-quinone mengalami beberapa reaksi untuk

akhirnya membentuk melanin. Sintesis melanin dalam sel melanositik pada akhirnya diatur oleh tirosinase, suatu glikoprotein yang mengandung tembaga yang terikat membran, yang merupakan enzim penentu kecepatan pembentukan melanin ³⁸. Tirosinase hanya diproduksi oleh sel melanositik, dan mengikuti sintesisnya dan pemrosesan selanjutnya di retikulum endoplasma dan Golgi, untuk selanjutnya di transfer dan diproses pada ke organel khusus, disebut melanosom, di mana pigmen disintesis dan disimpan. Di dalam kulit dan rambut, melanosom ditransfer dari melanosit ke keratinosit tetangga dan didistribusikan di jaringan tersebut untuk menghasilkan warna yang terlihat.

Enzim tirosinase mengubah asam amino, asam tirosin menjadi dihidroksifenilalanin (DOPA) dan menjadi bentuk kuinoidnya, DOPA quinone, yang merupakan dasar pembentukan kedua jenis melanin, eumelanin (coklat tua) dan pheomelanin (kuning kemerahan) ³⁹. Kombinasi keduanya jenis bertanggung jawab untuk warna kulit, yang bervariasi dari kulit ke kulit. Tirosinase dikendalikan oleh radiasi UV dan diinduksi oleh α -MSH ³⁸. Stimulator tirosinase lebih lanjut adalah -endorfin. Terkait endorfin zat dapat ditemukan dalam ekstrak sayuran dan bersama-sama dengan asetil tirosin sintetis, prodrug tirosin, mereka mampu menginduksi pembentukan melanin independen UV. Paparan radiasi UV akan mempercepat dan merangsang proses pembentukan melanin ⁴⁰. Kompleks zymo-tan, aktivator penyamakan, terdiri dari tirosin asam amino (prekursor melanin) dan tirosinase. Tirosinase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan melanin dengan adanya radiasi matahari ³⁵.

2.3. *Hiperpigmentasi*

2.3.1. Definisi

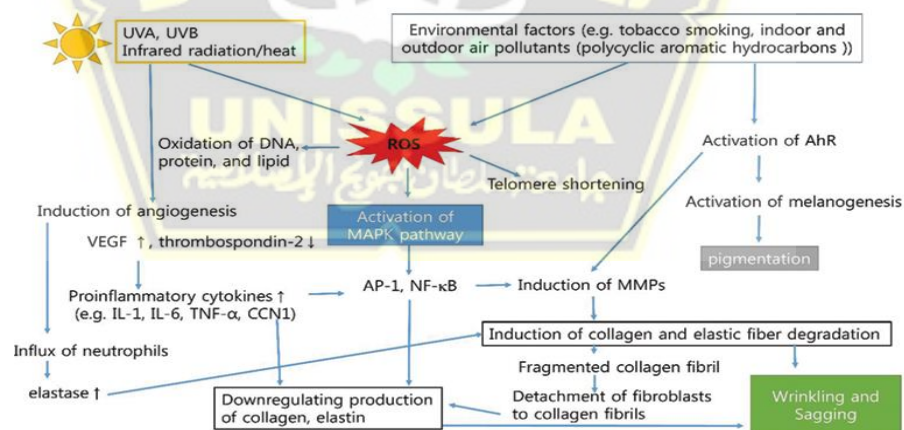
Hiperpigmentasi adalah penuaan dini pada kulit yang disebabkan oleh paparan berulang oleh radiasi UVB, terutama dari matahari tetapi juga dapat disebabkan oleh sumber UVB buatan. *Photoaging* berbeda dari penuaan intrinsik dimana efek merusak dari sinar UVB mengubah struktur kulit normal secara cepat dan signifikan⁴¹.

2.3.2. Proses *Hiperpigmentasi*

Hiperpigmentasi akan terjadi apabila kulit terpapar sinar UVB secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu. Pejalan kronis sinar UVB dan UVB sangat berperan dalam terjadinya *photoaging* dan *photocarcinogenesis*⁴². Kerusakan kulit pada *photoaging* dapat terjadi pada komponen epidermis, dermis maupun jaringan *appendages* kulit. Salah satu perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit yang mengalami *photoaging* dapat berupa meningkatnya jumlah melanin dan berkurangnya jumlah kolagen secara bermakna⁴³. Kolagen merupakan bagian terbesar dari lapisan dermis, berkontribusi sekitar 70% dari massa kering kulit, sehingga kerusakannya merupakan penyebab utama manifestasi penuaan kulit berupa kerutan (*wrinkle*), hilangnya elastisitas, kekenduran (*sagging*) dan pigmentasi. Pigmentasi kulit disebabkan karena meningkatnya kadar melanin yang signifikan akibat paparan dari luar.

Dua regulator utama pada proses pembentukan kolagen oleh sel fibroblas adalah transforming growth factor (TGF- β) dan activator protein

(AP-1). TGF- β merupakan sitokin yang merangsang produksi kolagen, sedangkan AP-1 merupakan faktor transkripsi yang menghambat produksi kolagen serta merangsang pemecahan kolagen. Penuaan ekstrinsik yang terutama disebabkan oleh radiasi sinar UVB (*photoaging*) akan menyebabkan peningkatan produksi ROS pada lapisan dermis. ROS tersebut akan memicu serangkaian reaksi molekuler berantai sehingga meningkatkan pembentukan AP-1 yang akan menstimulasi proses transkripsi enzim MMP yang berperan dalam proses degradasi kolagen. ROS bersama dengan AP-1 juga memiliki peranan dalam menghambat sintesis kolagen dengan cara menghambat reseptor tipe 2 dari TGF- β . Serangkaian proses tersebut pada intinya akan menyebabkan peningkatan pemecahan kolagen serta penurunan produksi kolagen yang merupakan dasar patofisiologi dari penuaan kulit ⁴⁴⁻⁴⁷ Skema patofisiologi penuaan kulit baik ekstrinsik dapat diringkas pada gambar 2.6. berikut ini.



Gambar 2.2. Skema degradasi kolagen akibat paparan sinar UVB

2.4. Melanin

2.4.1. Definisi melanin

Melanin adalah pigmen pengatur warna kulit yang diproduksi melalui proses melanogenesis⁴⁸. Melanogenesis adalah proses fisiologis yang menghasilkan sintesis biopolymer yang menghasilkan pigmen berwarna gelap. Melanin disintesis oleh melanosom dan organel terkait lisosom dalam melanosit. Melanin berfungsi membantu melindungi kulit dari efek berbahaya sinar matahari dan bahan kimia^{49,50}. Kadar melanin normal pada kulit manusia $\pm 3\%$ pada usia dewasa, kadar melanin akan semakin meningkat dengan meningkatnya usia⁵¹.

Terdapat dua jenis melanin yaitu eumelanin dan pheomelanin. Dalam jalur melanogenesis, terdapat tiga enzim utama yang terlibat yaitu tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1, yang biasa disebut gp75 glycoprotein atau gp75), dan tyrosinase-related protein 2 (TRP-2, yang biasa disebut dopachrome tautomerase atau Dct). Proses melanogenesis dimulai baik dengan hidroksilasi fenilalanin menjadi L-tirosin atau langsung oleh L-tirosin, yang kemudian dihidroksilasi menjadi L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). L-DOPA selanjutnya dioksidasi menjadi L-DOPAquinone. Kedua reaksi ini dikatalisis oleh tyrosinase, yang oleh karena itu merupakan enzim kunci dalam melanogenesis³⁸.

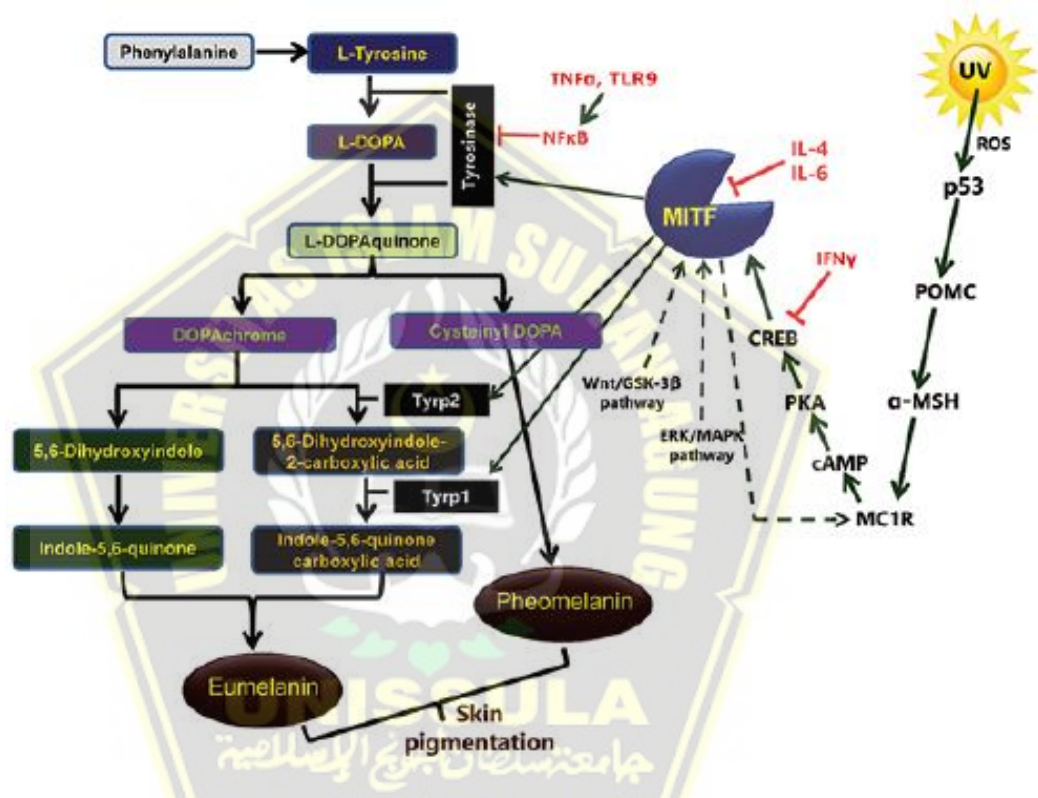
Jalur downstream melanogenesis melibatkan penambahan intramolekuler dari gugus amino ke TRP-2 sehingga menghasilkan DOPochrome. Setelah pembentukan L-DOPAquinone, jalur downstream

melanogenesis dibagi menjadi 2 bagian yaitu yang mengarah ke sintesis “*black-brownish eumelanin*” dan “*red-yellow pheomelanin*”. Dalam jalur eumelanogenesis, DOPAchrome secara spontan diubah menjadi 5,6-dihidroksiindol atau secara enzimatis diubah menjadi asam 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilat oleh TRP-2. Akhirnya, polimerisasi indol dan kuinon menghasilkan pembentukan eumelanin⁵². Sintesis pheomelanin bergantung pada keberadaan sistein, yang bereaksi dengan L-DOPAquinone membentuk sisteinil-DOPA dan selanjutnya diubah menjadi kuinolin, kemudian, akhirnya, berpolimerisasi menjadi pheomelanin (Gambar 2.1). Meskipun melanin memainkan peran kunci dalam melindungi kulit dari radiasi ultraviolet (UVB) yang berbahaya, produksi dan akumulasi melanin yang tinggi secara tidak normal di kulit dapat menyebabkan gangguan hiperpigmentasi.

2.4.2. Mekanisme Sintesis Melanin

Melanogenesis diatur melalui serangkaian multistep kaskade transduksi sinyal yang terkait dengan enzim tyrosinase, TRP-1 dan TRP-2 (Gambar 2.1). Mekanisme utama regulasi melanin melalui paparan radiasi ultraviolet yang menginduksi melanogenesis melalui p53. Tumor suppressor protein p53 yang diinduksi radiasi UVB secara kritis mengatur ekspresi dan aktivitas tirosinase dan TRP-1⁵³. Promotor proopiomelanokortin (POMC) berisi urutan konsensus p53, di mana p53 mengikat dan mengatur ekspresi gen ini. Aktivasi p53 yang diinduksi paparan UVB menghasilkan peningkatan ekspresi POMC, yang kemudian dibelah menjadi peptida kecil, seperti

ACTH, α -, β -, dan γ -MSH. α -MSH yang diturunkan POMC menstimulasi reseptor melanokortin-1 (MC1R) pada melanosit, menghasilkan peningkatan produksi eumelanin. Selain itu, radiasi UVB meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) di keratinosit dan melanosit, dan pada konsentrasi tinggi ROS menyebabkan kerusakan DNA, mengaktifkan p53 lebih lanjut sehingga memicu melanogenesis⁵⁴.



Gambar 2.3. Skema kaskade transuksi sinyal melanogenesis³⁸

Mekanisme kedua yaitu regulasi intrinsik melanogenesis melalui microphthalmia-associated transcription factor (MITF). MITF adalah faktor transkripsi, yang berisi struktur dasar helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-LZ) dan bertindak sebagai pengatur utama perkembangan melanosit, kelangsungan hidup, dan fungsinya. MITF mengatur enzim utama

melanogenik seperti tirosinase, TRP-1 dan TRP-2^{2,54}. Beberapa jalur pensinyalan yang terlibat dalam regulasi MITF sebagai berikut:

1. *cAMP-dependent signalling pathway*. Setelah reseptor MC1R pada melanosit distimulasi oleh α -MSH dan memicu produksi cAMP melalui aktivasi adenylyl cyclase. cAMP selanjutnya mengaktifkan protein kinase A (PKA), yang memfosforilasi protein pengikat elemen respons cAMP (CREB) dan mengarahkan pada regulasi MITF⁵⁵. MITF mengatur transkripsi gen pigmen yang mengkode *melanogenesis-related protein* (MRP) melalui interaksi dengan M- dan E- box yang ada di wilayah promotor tirosinase, TRP-1 dan TRP-2⁵⁶.

2. *ERK / MAPK signalling pathway*.

Penghambatan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) akan menghambat pergantian MITF dengan keberadaan sikloheksimida, sehingga melibatkan *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) / MAPK dalam degradasi MITF⁵⁷. Dalam jalur ini, interaksi reseptor ligan mengaktifkan protein Ras, yang selanjutnya mengaktifkan B-Raf kinase dan akibatnya ERK1/2. MAPK memfosforilasi protein MITF yang mengarah ke ubiquitination dan degradasi MITF yang mengakibatkan penurunan ekspresi gen yang berhubungan dengan melanogenesis⁵⁸.

3. Melanogenesis yang dimodulasi akibat sistem kekebalan. Melanosit adalah faktor aktif dalam sistem kekebalan kulit, memainkan peran penting dalam respons imun, dan memiliki sifat imunomodulator. Di sisi lain, mediator imun, seperti sitokin, secara langsung atau tidak langsung

mengatur proliferasi, diferensiasi melanosit, dan melanogenesis. Misalnya, IL-4 menghambat melanogenesis dan menurunkan ekspresi gen terkait melanogenesis melalui aktivasi jalur JAK2-STAT6. IL-6 menekan melanogenesis dengan mengurangi ekspresi tirosinase dan transkrip MITF. TNF- α menghambat melanogenesis terutama melalui *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) dan mengurangi waktu paruh tirosinase. Interferon-gamma (IFN- γ) juga terlibat dalam patogenesis vitiligo, di mana IFN- γ diketahui menginduksi apoptosis pada melanosit. Hal ini menghambat melanogenesis dengan mengubah ekspresi enzim melanogenik dan menghambat pengikatan CREB ke promotor MITF melalui STAT1. Selain itu, IFN- γ mempertahankan homeostasis pigmentasi kulit dan memediasi hipopigmentasi melalui IRF1, yang selanjutnya mengontrol pematangan melanosom dalam melanosit.

Toll-like receptors (TLRs), yang mengenali pola molekuler terkait patogen (PAMP) yang ada dalam mikroba, secara negatif juga mengatur melanogenesis. Melanosit manusia secara konstitutif mengekspresikan mRNA dan protein untuk TLR 2, 3, 4, 5, 7, 9 dan 10, dan TLR ini memainkan peran penting dalam modulasi melanogenesis. Namun, mekanisme pasti yang digunakan TLR untuk mengontrol melanogenesis tidak dipahami dengan jelas. Sebuah studi terbaru menunjukkan bahwa TLR9 mengatur melanogenesis melalui aktivasi NF- κ B⁵⁹.

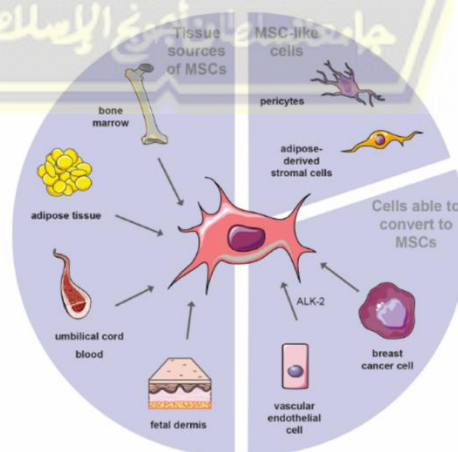
2.5. *Mesenchymal Stem Cells (MSCs)*

2.5.1. Definisi

Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adipositi, dan neurosit. Mesenchymal stem cell dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat⁶⁰. Secara umum, MSCS diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotipe, 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 osteogenic⁶¹.

2.5.2. Sumber MSCs

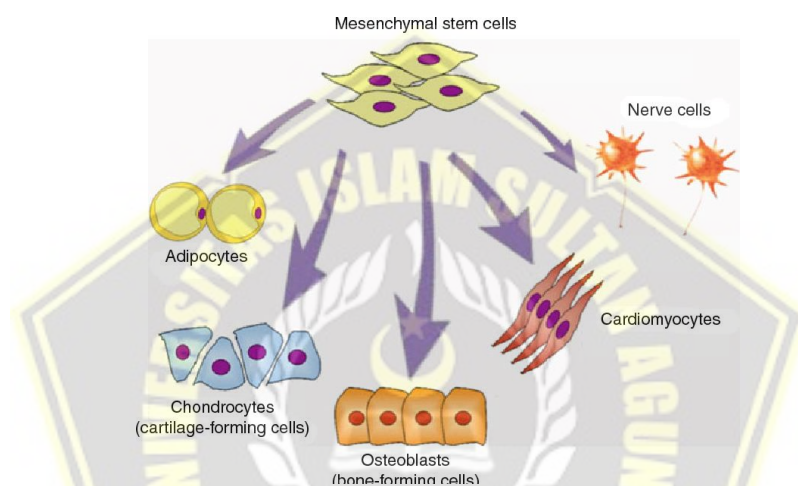
MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta⁶⁰.



Gambar 2.4. Sumber *mesenchymal stem cell (MSCs)*⁶²

2.5.3. 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 miosit ²⁹. Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekspresi beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit ⁶³.



Gambar 2.5. Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁶⁴

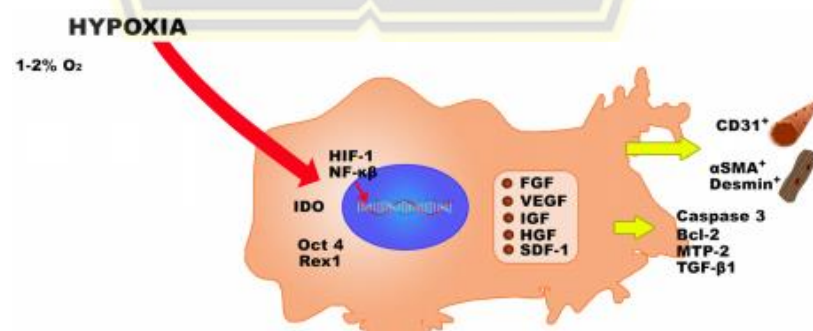
2.5.4. Peran MSCs

Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi 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 ^{65,66}.

2.6. Hipoksia

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, self renewal, dan pelekatan MSCs ⁶⁷. Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs (Gambar 2.6).



Gambar 2.6. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs ⁶⁸

2.7. Sekretom *Mesenchymal Stem Cell*

MSCs diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang disebut sekretom, biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, IL, *growth factor* (GF), hormon, eksosom, mikrovesikel, faktor antiinflamasi dll^{69,70}. Faktor-faktor ini dianggap sebagai protagonis untuk berpartisipasi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan melalui parakrin yang memediasi pensinyalan sel ke sel. Dalam hal regenerasi kulit, salah satu sitokin yang bertanggung jawab yaitu TGF β ^{71,72}. TGF β memiliki peran kunci dalam regulator sintesis prokolagen I⁷³. TGF β secara signifikan terbukti menghambat sintesis melanin dan mengurangi aktivitas tyrosinase dan enzim-enzim yang berperan dalam jalur melanogenesis. TGF β juga menurunkan aktivitas MITF dan menurunkan produksi protein MITF, TRP-1, TRP-2 dan tyrosinase. Lebih lanjut TGF β menginduksi penundaan aktivasi ERK *signaling pathway*^{21,73}. Disisi lain TGF β menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan MITF tidak aktif⁷⁴. Kandungan IL-10 yang tinggi pada sekretom dapat menghambat produksi ROS sehingga menurunkan inflamasi dan aktivasi p53^{17,18}.

2.8. Sediaan Gel

Beberapa bentuk sediaan topikal antara lain gel, krim, pasta dan salep. Bentuk sediaan yang nyaman untuk penggunaan topical adalah bentuk sediaan gel. Gel terdiri dari suspensi semipadat yang terbuat dari partikel anorganik kecil atau molekul organik besar, yang terpenetrasi oleh suatu cairan. Sediaan gel

memiliki kelebihan antara lain mempunyai sifat tiksotropi sehingga bila dioles mudah merata, tidak mudah mengalir pada permukaan kulit karena mempunyai viskositas dan daya lekat yang tinggi, tidak berbekas, hanya lapisan tipis seperti *film* saat dipakai, terdapat sensasi dingin saat digunakan dan mudah dicuci dengan air, penetrasinya lebih dalam dibandingkan krim, dapat digunakan pada area berambut dan secara kosmetika lebih disukai, gel cepat mencair bila kontak dengan kulit ⁷⁵.

Polimer-polimer yang umum digunakan untuk membuat gel-gel farmasetik antara lain pektin gom alam tragakan, karagen, asam alginat, agar, serta bahan semisintetis dan sintetis seperti hidroksi etil selulosa, metil selulosa, karboksi metil selulosa, dan karbopol yang merupakan polimer vinil sintetis dengan gugus karboksil yang terionisasi. Gel dibuat melalui proses peleburan, atau memerlukan prosedur khusus berkaitan dengan sifat mengembang gel. Bahan pembentuk gel idealnya harus bersifat inert, tidak ada perubahan viskositas pada penyimpanan yang normal, aman dan tidak bereaksi dengan bahan-bahan lain dalam formula ⁷⁶.

Konsistensi gel dikarenakan bahan pembentuk gel yang setelah mengabsorpsi air akan membentuk struktur tiga dimensi. Gel mengabsorpsi larutan dan mengembang, dengan meningkatkan volume. Pengembangan merupakan tahap awal disperse yaitu terjadi penetrasi fase dari luar kedalam matriks gel dan menimbulkan interaksi diantara pembentuk gel dan solven. Gel merupakan interaksi diantara unit-unit fase koloidal dari senyawa anorganik dan organik, tidak terpisah dari fase luar, membentuk *structural viscosity*.

Karakteristik gel harus disesuaikan dengan tujuan penggunaan gel, misalnya pada gel topikal jangan terlalu liat, konsentrasi dan berat molekul bahan pembentuk gel yang digunakan jangan terlalu tinggi sehingga dapat menyebabkan gel sulit didispersikan dan dioleskan ⁷⁷.

Pemilihan basis dalam pembuatan gel, dapat mempengaruhi karakter gel yang terbentuk. Basis gel terbagi atas basis gel hidrofilik dan hidrofobik. Basis gel hidrofilik memiliki sifat yang memperlambat pengeringan sehingga cocok digunakan secara topikal karena kemampuannya bertahan lama di permukaan kulit. Gel hidrofilik mempunyai sistem koloid yang lebih stabil dan lebih mudah dibuat dibandingkan gel hidrofobik. Gel hidrofobik memiliki dasar yang terdiri atas fase anorganik, hanya sedikit interaksi diantara dasar gel hidrofobik dengan fase pendispersinya. Bahan hidrofobik tidak menyebar dengan spontan.

Karakteristik cairan gel terbagi menjadi gel hidrofilik dan gel hidrofobik ⁷⁸:

- a. Gel hidrofilik, mempunyai basis terdiri dari molekul organik yang besar dan larut dengan fase pendispersi. Sistem koloidnya lebih stabil dan lebih mudah dibuat dibandingkan hidrofobik. Gel hidrofilik mengandung bahan pengembang, penahan lembab, air, dan pengawet. Karakteristik gel hidrofilik ini mempunyai aliran tiksotropik, kompatibel dengan beberapa eksipien, tidak lengket, larut dalam air, mudah menyebar dan mudah dibersihkan.

- b. Gel hidrofobik, basisnya mengandung minyak lemak atau polietilen dan parafin cair dengan bahan pembentuk gel koloidal silika atau zink sabun atau aluminium. Gel ini tersusun dari partikel anorganik, kemudian akan terjadi interaksi dengan basis gel jika ditambahkan ke dalam fase pendispersi. Basis gel hidrofobik tidak secara spontan menyebar.

Kontrol kualitas sediaan gel, meliputi ⁷⁹:

- a. Organoleptis, merupakan diskripsi sediaan gel yang terdiri atas warna, bentuk, bau, dan kejernihan. Pengamatan dilakukan secara makroskopis.
- b. Homogenitas, sediaan gel yang dihasilkan harus tercampur homogen dan merata. Pengujian homogenitas dapat dilakukan dengan cara visual. Homogenitas gel diamati di atas kaca objek dengan adanya bantuan cahaya.
- c. Daya sebar, berkaitan dengan kenyamanan pada pemakaian, mudah dioles tanpa perlu penekanan yang berlebih. Sediaan topikal diharapkan memiliki daya sebar yang baik.
- d. Daya lekat, adalah kemampuan menempel pada lapisan epidermis, pengujiannya untuk mengetahui kemampuan melekat atau waktu retensi yang dihasilkan saat digunakan.
- e. Viskositas, memperngaruhi sifat sediaan dalam campuran dan sifat alirnya pada saat proses produksi, proses pengemasan, serta sifat-sifat penting pada saat pemakaian, seperti daya sebar, konsisitensi atau bentuk, dan kelembaban. Selain itu, viskositas dapat mempengaruhi bioavailabilitas dan stabilitas fisik. Semakin tinggi viskositas, menyebabkan daya lekatny

semakin besar, sedangkan daya sebaranya akan semakin kecil. Viskositas sediaan dapat dinaikkan dengan penambahan polimer.

- f. pH, diukur segera pada saat sediaan telah selesai dibuat diharapkan nilai pHnya sama dengan nilai pH tempat pemakaian atau kulit untuk mencegah terjadi iritasi. Kulit manusia memiliki pH normal antara 4,5-6,5.

2.9. Farmakinetik Obat Topikal

Farmakokinetik sediaan topikal merupakan gambaran terhadap jalannya bahan aktif yang diaplikasikan ke kulit pada konsentrasi tertentu, lalu diserap oleh lapisan kulit, kemudian didistribusikan secara sistemik. Hal ini penting dalam menentukan sediaan topikal yang akan dipakai untuk terapi⁸⁰.

Sediaan topikal setelah diaplikasikan secara umum akan melewati tiga bagian yaitu: permukaan kulit, stratum korneum, dan jaringan yang sehat. Stratum korneum merupakan reservoir bagi vehikulum, dimana kandungan didalam obat kontak dengan permukaan kulit tetapi belum terjadi penetrasi, namun tidak dapat dihilangkan walaupun dihapus oleh pakaian atau digosok.

Sediaan obat tertentu dapat menyebabkan bahan aktif langsung menembus hipodermis. Vehikulum sediaan topikal mengandung unsur yang dapat mengalami evaporasi, sehingga kemudian zat aktif berikatan pada lapisan yang dilewatinya misalnya epidermis, dermis, selanjutnya zat aktif akan diserap oleh vaskuler dermis dan hipodermis kulit⁷⁶.

2.9.1. Jalur Penetrasi sediaan Topikal

a. Penetrasi transepidermal

Penetrasi transepidermal melalui jalur interseluler dan intraseluler. Jalur penetrasi yang utama melalui interseluler, menembus lapisan stratum korneum melewati ruang antar sel korneosit yang dikelilingi lapisan lipid, berdifusi pada matriks lipid protein stratum korneum, kemudian akan menembus epidermis di bawahnya, dan berdifusi ke pembuluh kapiler.⁴⁰ Jalur penetrasi intraseluler, obat berdifusi menembus dinding sel korneosit dan melewati matriks lipid protein stratum korneum, kemudian menuju sel di lapisan bawahnya sampai ke pembuluh kapiler di bawah stratum basal epidermis dan berdifusi ke kapiler.

b. Penetrasi transfolikular

Penetrasi folikular diperlihatkan pada percobaan in vivo, terdapat molekul yang kecil seperti kafein berpenetrasi melalui rute folikular selain melalui sel korneum. Difusi obat melewati celah folikel rambut serta kelenjar sebacea dan selanjutnya berdifusi ke pembuluh kapiler

81.

2.9.2. Absorpsi sediaan topikal secara umum

Absorpsi sediaan topikal yang dioleskan ke kulit, melalui beberapa fase:⁴⁰

- a. Lag phase, fase ini saat sediaan dioleskan ke kulit dan belum menembus stratum korneum, sehingga bahan aktif obat pada fase ini belum ada dalam pembuluh darah.
- b. Rising phase, sebagian sediaan sudah mulai menembus stratum korneum kulit, dan masuk pembuluh kapiler dermis, sehingga obat sudah ditemukan di pembuluh darah.
- c. Falling phase, adalah fase dimana bahan aktif obat dilepaskan dari permukaan kulit dan dibawa ke pembuluh kapiler lapisan dermis.

Gel mampu berpenetrasi menembus lapisan hipodermis, serta mampu membentuk lapisan absorpsi yang menyebabkan difusi secara transfolikuler juga baik, sehingga banyak digunakan pada sediaan gel analgetik yang memerlukan penetrasi yang baik⁷⁵.

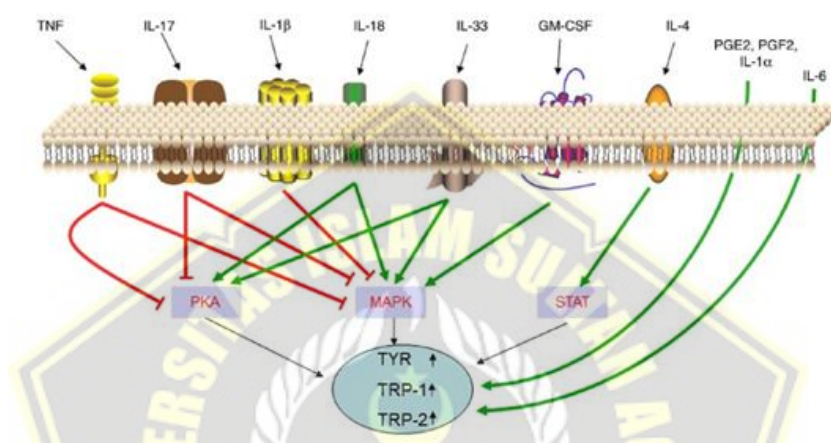
2.10. Peran dan Mekanisme Faktor Inflamasi pada Regulasi Melanogenesis

Inflamasi adalah proses patologis dasar yang melibatkan reaksi pertahanan jaringan hidup dengan sistem vaskular sebagai respons terhadap stimulasi berbagai faktor kerusakan. Faktor kimia yang terlibat dalam memediasi reaksi inflamasi disebut mediator kimia atau mediator inflamasi. Mediator inflamasi di kulit terutama disekresikan oleh Th sel, limfosit, monosit-makrofag, sel dendritik, dan sejenisnya. Sel Th terutama diklasifikasikan sebagai sel Th1 dan Th2⁸². Sel Th1 memainkan peran penting dalam respon imun seluler, mensekresi sitokin seperti interferon- γ (IFN- γ), *tumor necrosis factor* (TNF), IL-2, IL-3, GM-CSF; Sel Th2 memainkan peran

kunci dalam respon imun humoral, mensekresi IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-3, GM-CSF serta sitokin lainnya. dalam tubuh normal, sitokin Th1 dan sitokin Th2 berada dalam keseimbangan. Ketika tubuh menderita penyakit tertentu, keseimbangan antara Th1 dan Th2 terganggu, dan terjadi pergeseran ke arah Th1 atau Th2⁸³. Sel T helper 17 (Th17) adalah subset sel T yang baru ditemukan yang mensekresi IL-17, IL-6, IL-21 dan IL-22 dan berpartisipasi dalam terjadinya imunitas bawaan dan inflamasi tertentu dengan mensekresi IL-17, IL-6 dan TNF- α . Studi telah mengungkapkan bahwa keratinosit dapat mensekresi IL-18, TNF, IL-1, GM-CSF, INF- γ , dan IL-3, fibroblas dapat mensekresi IL-33, TNF, IL-6, dan IL-8, dan melanosit dapat mensekresi INF- β , IL-1, IL-8, IL-10 dan TNF- α ²⁴. Mediator inflamasi utama yang disekresikan oleh berbagai jenis sel di kulit disajikan pada Tabel i. studi terbaru telah mengungkapkan bahwa faktor inflamasi lokal kulit mungkin terlibat dalam regulasi pigmentasi kulit. Fungsi dan mekanisme faktor inflamasi ini dalam mengatur melanogenesis disajikan pada Tabel 2.1.

IL-18 dapat meningkatkan ekspresi kaskade dari MITF dan enzim hilir dengan mengaktifkan p38/MAPK dan jalur PKA, sehingga mempromosikan melanogenesis dan upregulate ekspresi TRP-1 dan TRP-2⁸⁴. Hal ini menunjukkan bahwa IL-18 dapat berpartisipasi dalam regulasi pigmentasi dengan mengatur melanosit. IL-33 dapat menginduksi sel mast untuk menghasilkan pro-inflamasi sitokin dan kemokin, sehingga mengaktifkan makrofag, sel CD4+T, basofil, sel dendritik dan neutrofil, dan meningkatkan peradangan kulit. mRNA IL-33 diekspresikan dalam banyak

organ pada manusia (termasuk kulit), dan khususnya, IL-33 mrna yang relatif melimpah ditemukan di keratinosit dan fibroblas. Penelitian terdahulu telah mengungkapkan bahwa IL-33 dapat meningkatkan biosintesis melanin di NHEM dan mempromosikan ekspresi MITF dan tirosin yang diatur di hilirnya, TRP-1, dan TRP-2 melalui aktivasi MAPK dan Jalur PKA, dengan demikian mempromosikan melanogenesis ²⁴.



Gambar 2.7. Peran sitokin dalam menghambat dan menstimulasi pembentukan melanin²⁴

TNF adalah sitokin homotrimerik, disekresikan terutama oleh monosit dan makrofag, dan juga oleh keratinosit, dendritic sel, Th1, Th17 dan Th22. itu berfungsi dengan mengikat dua reseptor yang berbeda: TNFR1/p55 dan TNFR2/p75 ⁸⁵. TNF tidak hanya menginduksi peradangan melalui aktivasi pembuluh darah sel-sel endotel dan sel-sel kekebalan, tetapi juga bertindak sebagai pengatur penting perkembangan jaringan limfoid dengan mengendalikan apoptosis. peningkatan kadar TNF telah terungkap pada peradangan pada beberapa penyakit autoimun, dan gejala inflamasi umumnya menurun setelah netralisasi TNF. Misalnya, level ekspresi yang lebih tinggi

dari TNF, TNFR1, dan TNFR2 diamati pada psoriasis. Studi telah mengungkapkan bahwa setelah pengobatan melanosit dengan baik IL-17 dan TTNF selama 24-48 jam, kadar C-KIT, MCL-R, MITF, dan TRP-2 mengalami penurunan, dan level tirosinase dan melanin berkurang secara signifikan. Memblokir TNF dapat menyebabkan pemulihan yang cepat ekspresi gen pigmentasi pada lesi psoriasis. Ini menunjukkan bahwa anti-TNF memiliki potensi untuk mengobati pigmen penyakit kulit ²⁴.

Tabel 2.1. Fungsi dan mekanisme faktor inflamasi pada regulasi melanogenesis ^{86,87}

Faktor	Sel eksperimen	Efek pada melanogenesis	Mekanisme
INF- γ	B16F10	Penghambatan	Memblok maturase melanosome dan meningkatkan regulasi STAT1 phosphorylation
TNF	Melanocytes, primary pooled human keratinocytes	Penghambatan	Menghambat pembentukan melanin melalui aktivasi jalur PKA dan MAPK
IL-1	Primary melanocytes, swine skin	Penghambatan	Kombinasi dengan KGF meningkatkan deposisi melanin
IL-6	Melanocytes	Penghambatan	Menurunkan aktivitas tirosinase

2.11. Pengaruh S-HMSCs terhadap ekspresi gen MITF, TRP-1 dan TRP-2

MSCs mensekresikan mediator-mediator dan *growth factor* yang mendukung regenerasi kulit, antara lain seperti sitokin antiinflamasi (IL-10), vascular endothelial growth factor (VEGF), *platelet derived growth factor*

(PDGF), hepatocyte growth factor (HGF), tumor necrosis factor alfa (TNF- α), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF β 1), angiopoietin, IL-1, IL-6, dan IFN γ yang akan mencegah pembentukan melanin. Kondisi hipoksia akan semakin memicu MSCs untuk mensekresikan molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator-mediator antiinflamasi dan *growth factor* ^{29,67} selanjutnya di sebut S-HMSCs.

Sitokin TNF, IL-1, dan IL-6 yang berasal dari S-HMSCs memiliki kemampuan untuk mencegah melanogenesis melalui penghambatan jalur MAPK sehingga menurunkan ekspresi enzim tyrosinase, TRP-1, dan TRP-2²⁴. *Growth factor* pada S-HMSCs seperti HGF terbukti menginduksi aktivasi jalur PI3K/Akt yang akhirnya meninhibisi aktivasi MITF pada sel melanoma²³. Disisi lain sitokin TNF, IL-1, dan IL-6 dapat mencegah melanogenesis melalui penghambatan jalur MAPK sehingga menurunkan ekspresi enzim tyrosinase, TRP-1, dan TRP-2²⁴. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa IL-10 secara langsung mampu menghambat enzim MITF. Kandungan lain dari sekretom adalah TGF β yang terbukti secara signifikan menghambat jalur ERK/MAPK dan PKA sehingga melanogenesis tidak terjadi ^{21,73}. Maka dengan adanya S-HMSCs, merupakan kandidat yang mampu mencegah terjadinya hiperpigmentasi kulit.

BAB III

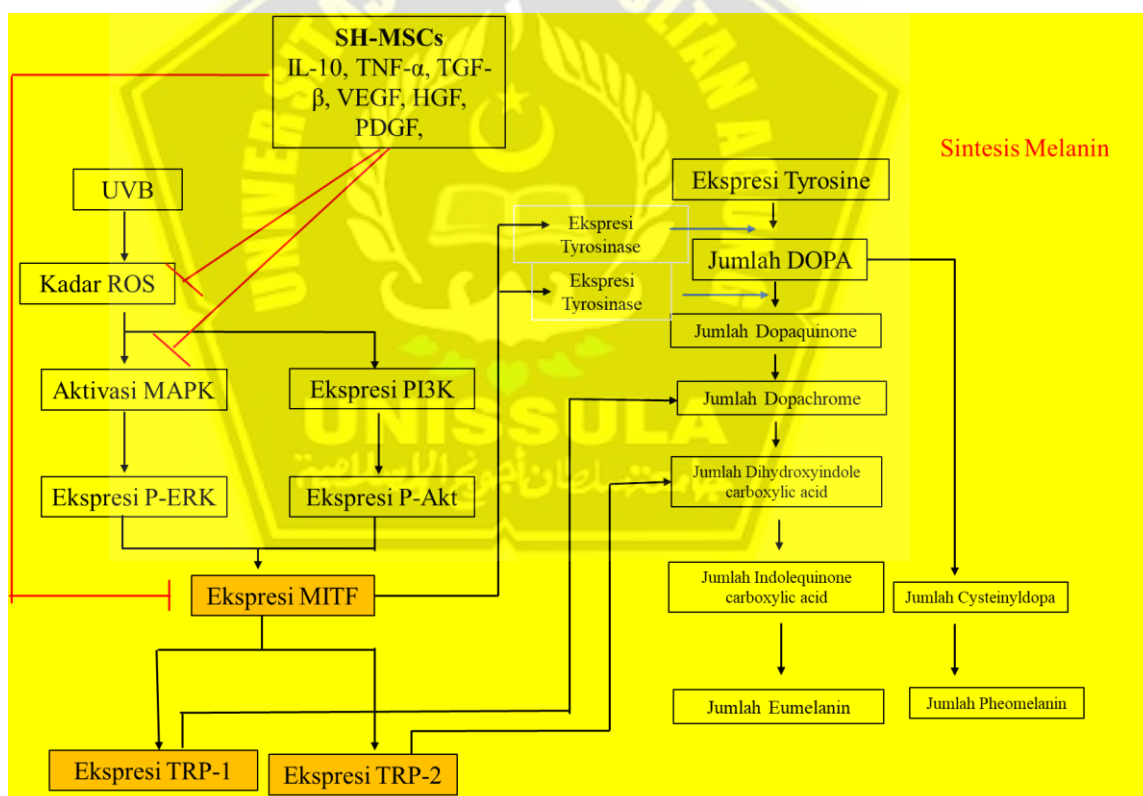
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB dari sinar matahari menginduksi peningkatan produksi ROS yang kemudian akan mengaktifasi MAPK Pathway. Aktivasi MAPK akan mengaktifasi ekspresi MITF. Aktivasi MITF ini menyebabkan produksi enzim tyrosinase meningkat, peningkatan produksi enzim ini akan mempercepat perubahan L-tyrosine menjadi L-DOPA yang merupakan sumber utama terbentuknya melanin²¹. Adanya aktivasi MITF menginduksi pelepasan enzim tyrosinase, TRP-1, dan TRP-2⁵⁴. Tyrosine yang terakumulasi dengan adanya enzim tyrosinase akan mengubah menjadi DOPA. DOPA dengan katalis yang sama akan berubah menjadi bentuk dopaquinone. Dopaquinone akan terbagi menjadi dua pathway untuk membentuk melanin, jalur pertama merubah DOPA menjadi cysteinylDopa dan akan membentuk pheomelanin. Jalur kedua dopaquinone akan membentuk dopachrome, adanya aktivasi TRP-2 akibat MITF akan merubah dopachrome menjadi dihydroxyindole carboxylic acid, selanjutnya akan di rubah menjadi indolequinone carboxylic acid oleh TRP-1 dan akhirnya membentuk melanin menjadi pigmen hitam pada kulit³⁹.

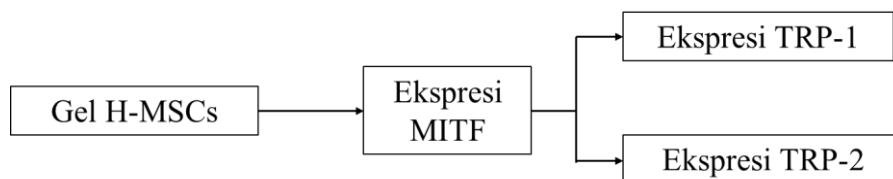
Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal²⁹. Sitokin-sitokin dan

mediator–mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10, IL-6, IL-1, TGF β , TGF α , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, TNF, IGF-1, dan HGF yang selanjutnya disebut sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (S-HMSCs). Pada penelitian ini sekretom diberikan secara topikal dengan pembawa matriks gel pada daerah *wrinkle* hasil induksi irradiasi UVB. Aktivitas sekretom akan turut mencegah produksi ROS akibat peran IL-10, inaktivasi jalur ERK/MAPK akibat peran TNF- α , IL-1, dan IL-6, inaktivasi MITF dan mengurangi produksi enzim tyrosinase, TRP-1, dan TRP-2 sehingga sintesis melanin tidak terbentuk⁵⁷.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka konsep

3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh penurunan ekspresi gen MITF pada kulit tikus model hiperpigmentasi diinduksi paparan sinar UVB setelah pemberian S-HMSCSs pada dosis (P1) 100 μ l dan (P2) 200 μ l dibandingkan dengan kontrol.
2. Terdapat pengaruh penurunan ekspresi gen TRP-1 pada kulit tikus model hiperpigmentasi diinduksi paparan sinar UVB setelah pemberian S-HMSCSs pada dosis (P1) 100 μ l dan (P2) 200 μ l dibandingkan dengan kontrol.
3. Terdapat pengaruh penurunan ekspresi gen TRP-2 pada kulit tikus model hiperpigmentasi diinduksi paparan sinar UVB setelah pemberian S-HMSCSs pada dosis (P1) 100 μ l dan (P2) 200 μ l dibandingkan dengan kontrol.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah tikus jantan galur wistar dengan bobot badan $200 \text{ gr} \pm 10 \text{ gr}$ ($\text{cv} = 5\%$).

Perlakuan terdiri dari:

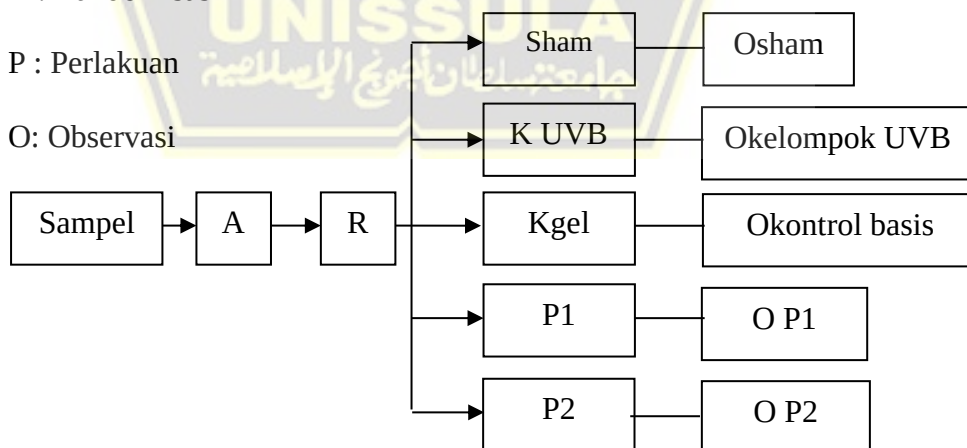
1. Kelompok: Sham (tidak diberi perlakuan),
2. Kelompok: Kelompok UVB (Irradiasi UVB tanpa diberi pengobatan)
3. Kelompok: Kontrol (pemberian basis gel),
4. Kelompok: P1 (pemberian gel S-HMSCs dosis $100 \mu\text{L}$),
5. Kelompok: P2 (pemberian gel S-HMSCs dosis $200 \mu\text{L}$),

A : Adaptasi

R : Randomisasi

P : Perlakuan

O: Observasi



Gambar 4.1. Gambar rancangan penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.2.1. Variabel bebas

Variabel bebas: gel S-HMSCs dosis 100 μ L dan 200 μ L.

4.2.2.2. Variabel Terikat

Variabel dependen: ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-2.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. *Mesenchymal Stem Cell* (MSCs) Hipoksia

MSC adalah *stem cell* yang memiliki bentuk menyerupai sel fibroblas (*fibroblast-shaped*), dapat melatkat pada permukaan plastik dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam jenis sel dewasa. Selain itu MSC mengekspresikan marker spesifik CD29+, CD4+ dan negatif marker CD45- dan CD31- di periksa dengan *flow cytometry*. MSC pada penelitian ini diisolasi dari tikus galur Wistar pada 19 hari masa bunting dan dikultur menggunakan medium DMEM yang dicampur dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS), antijamur dan antibiotik. MSCs kemudian dimasukkan ke dalam Hypoxic chamber dan diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Dosis MSCs hipoksia yang

digunakan sebanyak $1,5 \times 10^6$ sel dan 3×10^6 sel untuk masing-masing kelompok perlakuan.

Skala: Rasio

4.2.2.2. Sekretom MSCs Hypoksia (S-HMSCs)

Sekretom adalah molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSC. Molekul larut meliputi faktor biologis aktif seperti sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan. Sekretom diperoleh dari medium hasil prekondisi MSC secara hipoksia. Kemudian dilakukan filtrasi dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration*. S-HMSCs kemudian dicampur dengan menggunakan gel berbasis air sebanyak 0,1 gram sebagai campuran. Sekretom yang digunakan dalam basis gen terbagi dalam beberapa kelompok yaitu kelompok P1 di berikan 100 μ l S-HMSCs dan kelompok P2 di berikan 200 μ l S-HMSCs.

Skala: Rasio

4.2.2.3. Hewan model hiperpigmentasi

Hewan model hiperpigmentasi adalah hewan model tikus jantan galur wistar yang dihilangkan bulu bagian dorsal dengan ukuran 2x2 cm dan mendapatkan paparan iradiasi sinar UVB dengan panjang gelombang 302 nm MED 390 mj/cm^2 selama 3 kali seminggu hingga 2 minggu. Hiperpigmentasi yang terbentuk divalidasi dengan

pengecatan melanin menggunakan spesifik staining fontana masson staining.

Skala: Rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen MITF

MITF adalah gen yang memiliki peran dalam pembentukan melanin untuk mengaktivasi enzim-enzim tyrosinase, TRP-1, dan TRP-2. Sampel jaringan diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala: Rasio

4.2.2.5. Ekspresi gen TRP-1

TRP-1 adalah gen yang memiliki peran dalam pembentukan melanin untuk merubah dihydroxyindole carboxylic acid menjadi indolequinone carboxylic acid. Sampel jaringan diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala: Rasio

4.2.2.6. Ekspresi gen TRP-2

TRP-1 adalah gen yang memiliki peran dalam pembentukan melanin untuk merubah dopachrome menjadi

dihydroxyindole carboxylic acid. Sampel jaringan diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala: Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari Animal House Integrated Biomedical Laboratory, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang dan timbul Hiperpigmentasi dengan paparan sinar UVB 302 nm dengan MED 390 mJ/cm².

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:

1. Umur 2-3 bulan.
2. Kondisi sehat dan tidak cacat.
3. Bobot badan 200-250 gram.

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tikus yang sakit selama masa penelitian.

4.3.2.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 5 perlakuan yaitu perlakuan Sham (tidak diberi perlakuan), K+ (hanya diberi paparan sinar UVBB 390 mJ/cm²), K- (hanya diberi gel tanpa tambahan zat lainnya), P1 (Pemberian gel S-HMSCs kadar 100 µL), dan P2 (Pemberian gel S-HMSCs kadar 200 µL).

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria Federrer sebanyak 6 ekor sampel per kelompok. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih jantan galur *Wistar* dengan masing-masing 6 ekor sampel per kelompok.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri Biosafety Cabinet (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, dissecting kit, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan

dengan menggunakan hypoxic chamber. Oxygen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam hypoxic chamber. Selain itu penelitian ini juga menggunakan peralatan berupa UVB light (broadband dengan peak emission pada 302 nm) dengan energi 390 mL/cm² yang diberikan 3 kali selama satu minggu hingga 2 minggu untuk menginduksi hiperpigmentasi pada pungung tikus, steril swab untuk mengoleskan gel S-HMSCs. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-2 adalah RT-PCR (Illumina).

4.4.2. Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alcohol 70%, PBS, Ketamin, dan Xylazine.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian didapatkan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

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

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan ke petri dish, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiao 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfulensi 80%.

4.5.3. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BDTM accutaseTM *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel /ml di dalam BD PharmingenTM Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline* (PBS) *buffer*. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.
2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen flowcytometry (Tabel 4.1).
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel kedalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.
7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
8. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam *flow cytometry*

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD29	5µl
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD90	5µl
3	PerCP-CyTm 5.5 <i>mouse anti-human</i> CD45	5µl
4	APC <i>Mouse anti-human</i> CD31	5µl
5	Kosong	-
6	hMSC <i>positive isotype control cocktail</i>	20µl
	hMSC <i>negative isotype control cocktail</i>	20µl
	hMSC <i>positive cocktail</i>	20µl
7	PE hMSC <i>negative cocktail</i>	20µl

4.5.4. Proses Hipoksia

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam hypoxic chamber.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indicator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFT untuk mendapatkan HypMSC-Scr yang selanjutnya dicampurkan dengan gel berbasis air sesuai dengan dosis P1 dan P2.

4.5.5. Pembuatan Sediaan Gel

1. Pembuatan sediaan gel dilakukan dengan cara mencampurkan basis gel hydrogel (Katecho) sebanyak 200 mg dengan sekretom pada P1 dan P2.
2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah mikroskop.

4.5.6. Pembuatan Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylasine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian punggung tikus potong hingga bersih.
3. Punggung tikus di iradiasi dengan UVB light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan minimal erythema dose (MED) 390 mJ/cm² (yang diukur dengan UV meter) sebanyak 3 kali seminggu (hari 1, 3, dan 5) selama 2 minggu menggunakan alat UV chamber⁸⁷.

4. Irradiasi UVB ditreatmen dengan pemberian gel topikal setiap hari yang mengandung HypMSC-Scr 100 μ l dan 200 μ L/kgBB. Tikus sham tidak di berikan treatmen apapun, sedangkan tikus control diberikan perlakuan basis gel.

4.5.7. Terminasi dan pengambilan jaringan

1. Terminasi tikus dengan menggunakan cocktail dosis lethal sebelum dilakukan pengambilan organ. Untuk pembuatan 10 mL cocktail digunakan Ketamine 50 mg/kgBB, Xylazine 10 mg/kgBB dan Acepromazine 2 mg/kgBB yang diinjeksikan secara intramuskular.
2. Setelah tikus meninggal, dilakukan koleksi organ kulit kemudian disimpan dalam cryotube yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later.

4.5.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel kulit difiksasi dalam formalin 10% dan dibuat menjadi blok paraffin.
2. Sampel kulit sebanyak 100 mg diambil dari RNA later kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang telah terisi 50 mL RNA Iso Plus.
3. Potongan kulit ditumbuk menggunakan micropastle dan ditambahkan lagi RNAIso Plus sebanyak 50 mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.

4. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
5. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.
6. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanolol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
7. Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.
8. Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan (Diethyl pyrocarbonat) DEPC lalu bolak balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40C.
9. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50 μ m. Campuran diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada

suhu -80°C . RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 ng.

10. Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 μl OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10 μl , kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70°C .
11. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 μl , DEPC-Treated H₂O 5 μl , ReverTraAce 1 μl . Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, 42°C selama 50 menit dan 85°C selama 5 menit.

4.5.9. Pembacaan MITF, TRP-1, dan TRP-2 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1. Ekspresi mRNA dari MITF, TRP-1, dan TRP-2 dianalisis menggunakan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).
2. Campuran dari 3 μl cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer and MgCl₂) sebanyak 12,5 μl , primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6 μl untuk primer forward dan reverse dan 8,3 μl Nuclease Free Water.
3. PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine.

4. Peningkatan ekspresi gen di analisis dalam ratio peningkatan terhadap housekeeping gen dengan menggunakan software EcoStudy.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

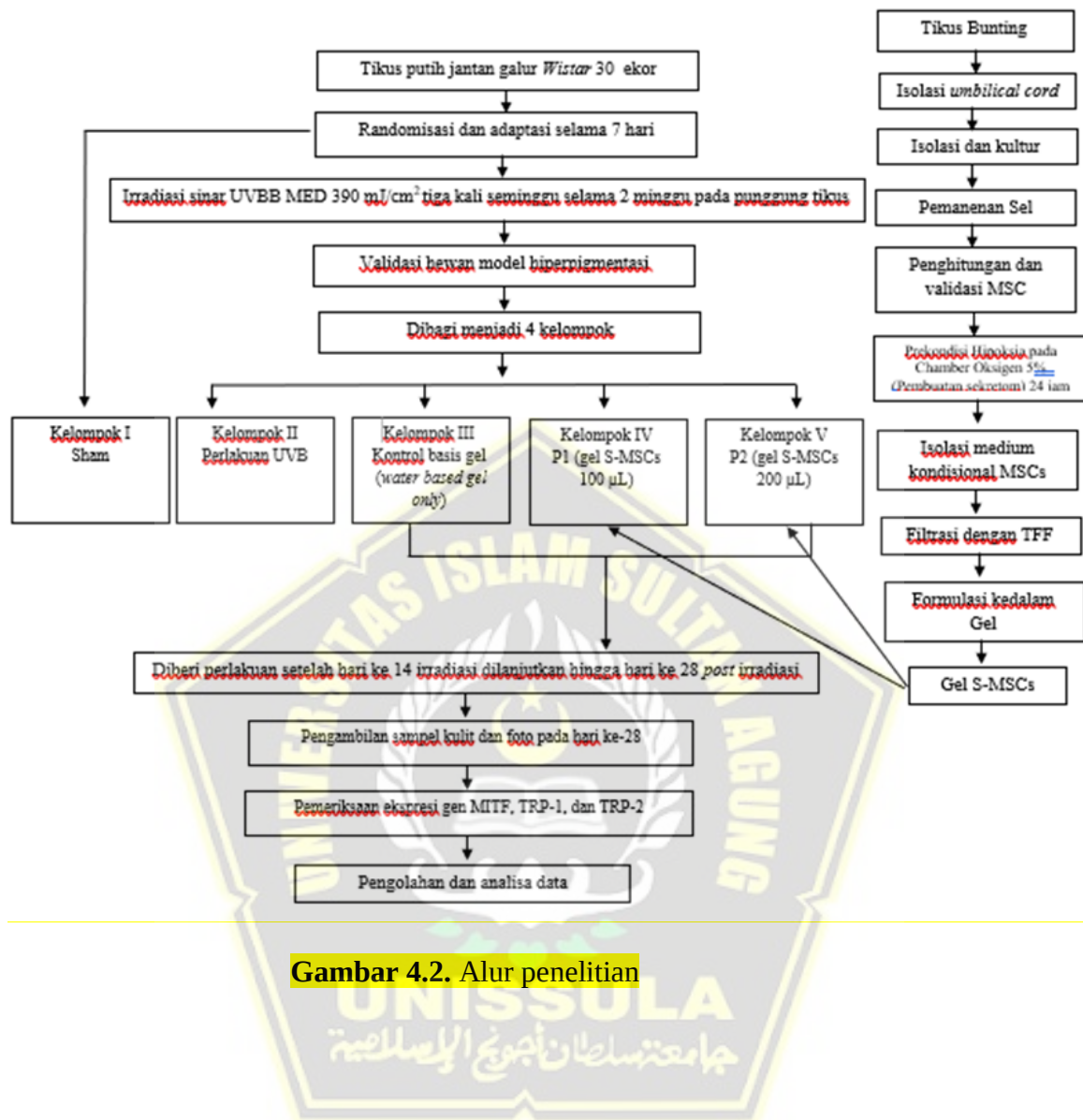
4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember – Januari 2021.

4.7. Analisa Data

Data yang sudah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji varian data dengan uji *Levene*. Apabila sebaran data normal dan varian data sama, maka akan dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Bila terdapat sebaran data tidak normal dan varian tidak sama, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0 for Windows.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

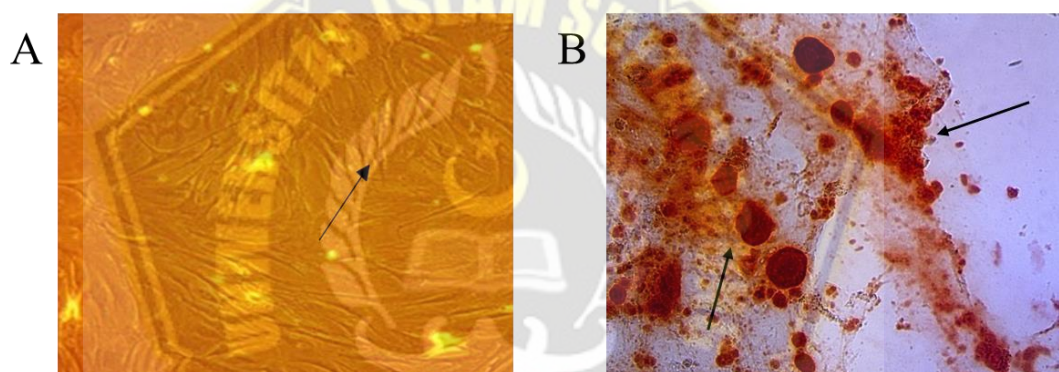
Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Januari 2022 hingga Februari 2022 di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 250- 300 gram dan berumur 4-6 bulan yang di induksi hiperpigmentasi menggunakan UVB 302 nm dengan intensitas energi $390\text{mJ}/\text{cm}^2$ ⁸⁷. Dalam penelitian ini dikumpulkan sampel sebanyak 30 ekor dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok dengan 2 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol basis gel, dan 1 kelompok kontrol positif , dan 1 kelompok sham. Kelompok perlakuan pertama (P1) terdiri atas 6 hewan uji dengan pemberian gel S-HMSCs dosis 100 μL dan kelompok kedua (P2) terdiri atas 6 hewan uji dengan pemberian gel S-HMSCs dosisi 200 μL . untuk kelompok kontrol basis gel terdiri dari 6 hewan uji yang mendapatkan basis gel (katechu) 0,1 gram tanpa S-HMSCs. Kelompok kontrol positif adalah 6 hewan uji yang mendapatkan paparan UVB tanpa pengobatan, sedangkan kelompok sham adalah kelompok tikus sehat tanpa perlakuan dan intervensi.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Isolasi Secretome Mesenchymal Stem Cell Hipoksia (S-HMSCs)

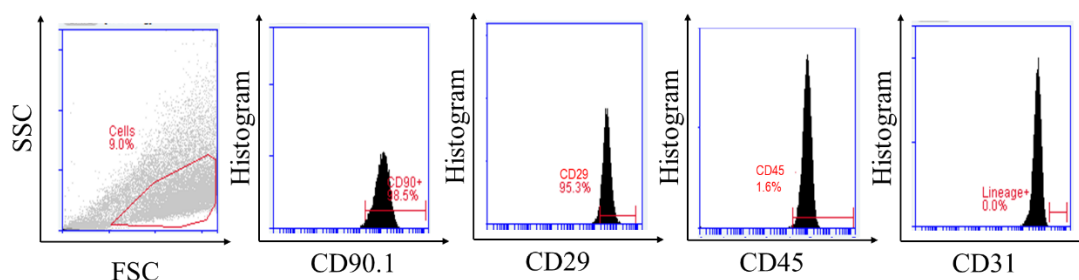
Isolasi MSCs dilaksanakan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, dengan standart steril. MSCs diisolasi dari *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil

isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask steril T75 dengan medium komplet khusus. Kultur MSCs yang adherent dan konfluen lebih dari 80% setelah pasase ke-4 memiliki morfologi spindle-like cell dalam pengamatan mikroskopis (Gambar 5.1- A). MSCs memiliki ciri khusus dapat berdiferensiasi menjadi sel osteosit, yang di tandai dengan endapan kalsium berwarna merah setelah pewaranaan dengan Alizarin red dye (Gambar 5.1-B). Dari hasil pengamatan ini sel hasil isolasi diidentifikasi sebagai MSCs karena memenuhi syarat dan karakteristik sel punca yaitu dapat diferensiasi menjadi lineage yang baru serta memiliki kemampuan multipotensi.



Gambar 5.1. (A) Isolasi MSCs dengan konfluen 80% didapatkan gambaran sel berbentuk spindle-like (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Diferensiasi osteogenic menggunakan pewarnaan Alizarin Merah muncul pada populasi MSC pada perbesaran 100x.

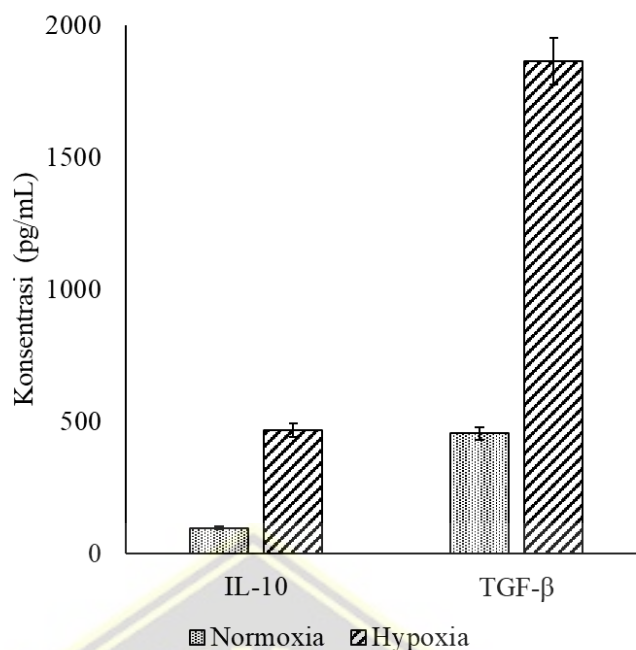
Hasil isolasi sel MSCs juga divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukan MSCs mampu mengekspresikan beberapa *surface marker* penanda MSCs. MSCs mampu mengekspresikan CD90 (98,50%), CD29 (95,30%) dan tidak mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (0,00%) (Gambar 5.2).



Gambar 5.2. Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31

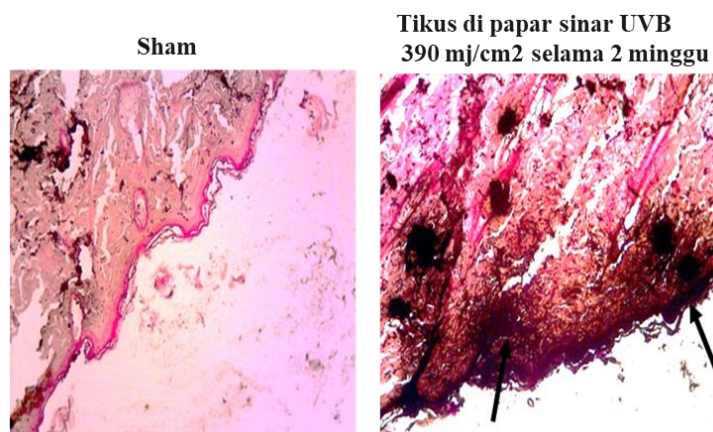
Sel MSCs diprekondisi hipoksia selama 24 jam dalam chamber hipoksia, selanjutnya medium kultur MSCs yang mengandung secretome dikoleksi dan dilakukan filtrasi menggunakan *tangential flow filtration* (TFF) hingga diperoleh molekul dengan ukuran 10-50 kDa yang mengandung *interleukin-10* (IL-10) dan *transforming growth factor beta* (TGF- β). IL-10 merupakan sitokin antiinflamasi yang menunjukkan fungsi dominan immunosupresif dan dapat dieksresikan MSC pada kondisi hipoksia, IL-10 memiliki ukuran ~18kDa monomer⁸⁸. TGF- β adalah *growth factor* yang memiliki peran menginduksi kolagen tipe I⁸⁹, TGF- β memiliki ukuran 25kDa dimer⁹⁰.

Pada kondisi hipoksia terjadi peningkatan konsentrasi IL-10 hingga 467 ± 25.30 pg/mL dibandingkan kondisi normoksia MSCs hanya mengeksresikan IL-10 sebanyak 96 ± 5.50 pg/mL. Hal tersebut juga terjadi pada konsentrasi TGF- β yang mengalami peningkatan 3x lipat pada kondisi hipoksia 1865 ± 87 pg/mL dibandingkan kondisi normoksia 454 ± 24 pg/mL (Gambar 5.3). Hal ini membuktikan bahwa prekondisi hipoksia secara signifikan meningkatkan sekresi sitokin anti-inflammasi dan *growth factor*⁹¹.



Gambar 5.3. Konsentrasi sitokin IL-10 dan growth factor TGF- β pada kondisi hipoksida dan normoksia pada secretom MSCs dibaca dengan ELISA. Data di representasikan dalam 3 kali ulangan $\pm$ SD.

Pada penelitian ini juga di lakukan validasi hewan model hiperpigmentasi yang di papir irradiasi UVB 390 mJ/cm². Hasil pewarnaan sampel kulit pada kelompok perlakuan UVB dengan fontana masson staining menunjukan terbentuk warna hitam pada bagian melanosit kulit (Gambar 5.4). Kondisi patogenesis hiperpigmentasi terkait paparan sinar UVB, salah satu indikator terpenting adalah melanogenesis. Melanin, dapat menyerap radiasi UVB dan memberikan fotoproteksi serta berinteraksi dengan keratinosit dalam proses sintesis melanin. Sintesis melanin berlebihan menginduksi kerusakan kulit dan hiperpigmentasi.



Gambar 5.4. Morfologi melanin kulit hewan model dengan pewarnaan fontana masson staining diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Tanda panah hitam menunjukan positif melanin.

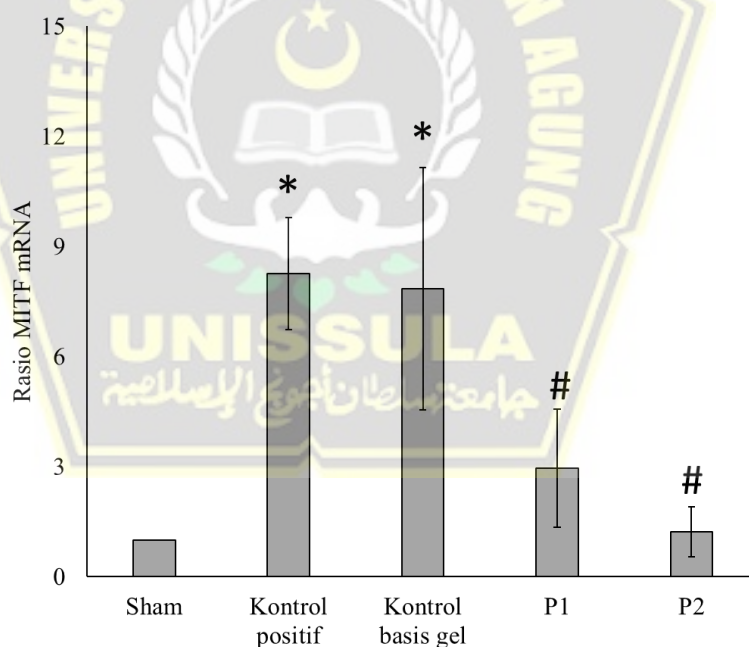
Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen MITF, TRP-1, dan TRP-2

Variabel	Kelompok					pvalue
	Sham n=5 Mean±SD	Kelompok UVB n=5 Mean±SD	Basis gel n=5 Mean±SD	P1 n=5 Mean±SD	P2 n=5 Mean±SD	
Ekspresi gen MITF	1.04±0.02	8.26±0.68	7.85±1.48	2.95±0.72	1.96±0.56	
<i>Saphiro wilk</i>	0.914	0.644	0.108	0.656	0.983	
<i>Levene test</i>						0.281
<i>One way Anova</i>						0.000
Ekspresi gen TRP-1	1.04±0.02	49.36±6.49	40.53±4.74	13.16±2.20	1.96±0.56	
<i>Saphiro wilk</i>	0.687	0.751	0.385	0.840	0.983	
<i>Levene test</i>						0.054
<i>One way Anova</i>						0.000
Ekspresi gen TRP-2	1.04±0.01	5.48±1.04	4.81±0.63	3.27±1.05	1.51±0.34	
<i>Saphiro wilk</i>	0.427	0.340	0.129	0.387	0.507	
<i>Levene test</i>						0.281
<i>One way Anova</i>						0.001

5.1.2. Efek Pemberian Gel S-HMSCs pada Ekspresi Gen MITF pada Tikus

Model Hiperpigmentasi

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) adalah faktor yang paling penting untuk regulasi melanogenesis dan fungsi melanosit pada kulit ³⁴. MITF tidak hanya mengatur ekspresi gen enzim melanogenik termasuk tirosinase dan *tyrosinase-related protein-1/2* (TRP1/2), tetapi juga perkembangan dan proliferasi sel melanosit ³⁹. Peningkatan ekspresi MITF berkaitan dengan peningkatan produksi sintesis melanin. Paparan iradiasi UVB terbukti menginduksi ekspresi gen MITF. Pada pemberian S-HMSCs ekspresi gen MITF sangat berkurang secara tergantung dosis (Gambar 5.4). Hal ini menunjukkan bahwa S-HMSCs mengatur pigmentasi dengan memodulasi degradasi MITF.



Gambar 5.5. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA MITF pada jaringan kulit masing-masing kelompok perlakuan. * Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ($p < 0.05$) dan # menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Tabel 5.2. Uji *Post-hoc* LSD ekspresi MRNA MITF antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sham	Kelompok UVB	0.000*	-9.6830	-4.7450
	Kontrol basis gel	0.000*	-9.2770	-4.3390
	P1	0.122	-4.3810	0.5570
	P2	0.446	-3.3890	1.5490
Kelompok UVB	Kontrol Basis gel	0.735	-2.0630	2.8750
	P1	0.000*	2.8330	7.7710
	P2	0.000*	3.8250	8.7630
Kontrol Basis gel	P1	0.001*	2.4170	7.3650
	P2	0.000*	3.4190	8.3570
P1	P2	0.412	-1.4770	3.4610

Uji *Post Hoc*:* mean difference significant $P < 0.05$

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian S-HMSCs 100 μ L (2.95 $\pm$ 0.72) dan 200 μ L (1.96 $\pm$ 0.56) secara berturut-turut menurunkan ekspresi gen MITF hingga 2.8 dan 4.2 kali lipat lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol perlakuan UVB (8.26 $\pm$ 0.68). Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan ekspresi gen MITF dibandingkan kontrol, namun tidak menunjukkan perbedaan signifikan jika dibandingkan kelompok sham (1.04 $\pm$ 0.02). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian S-HMSCs mampu menurunkan ekspresi gen MITF setara dengan kondisi normal tanpa irradiasi UVB.

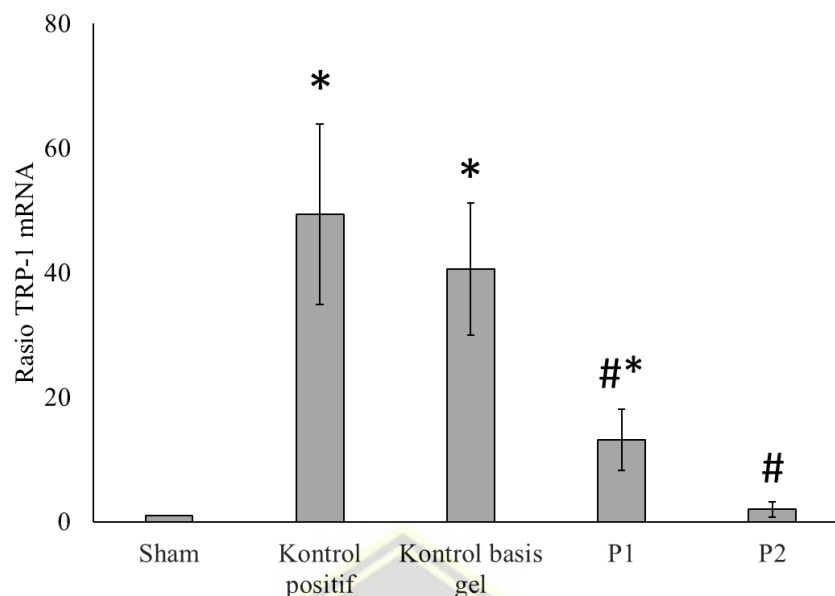
Pada data deskriptif ekspresi den MITF masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok $p > 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa 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 5.4 dan tabel 5.2. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan gel S-HMSCs dengan kelompok kontrol positif, kelompok basis gel, dan kelompok sham.

5.1.3. Efek Pemberian Gel S-HMSCs pada Ekspresi Gen TRP-1 pada Tikus Model Hiperpigmentasi

Tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) adalah salah satu protein yang terdapat dalam membran melanosom. TRP-1 memiliki peran dalam aktivasi dan stabilisasi tirosinase, sintesis melanosom, peningkatan rasio eumelanin/pheomelanin dan berperan terhadap stres oksidatif karena efek peroksidasinya⁵². Protein TRP-1 juga berperan dalam mengatur proliferasi dan kematian sel melanosome⁴⁰. Melanosit kulit normal secara konsisten mengekspresikan TRP-1. Berdasarkan sejumlah kasus yang diteliti, ekspresi TRP-1 pada nevus melanositik cenderung sejajar dengan ekspresi tirosinase. TRP-1 hingga saat digunakan sebagai penanda imureaktif terbentuknya melanoma⁹².

Peningkatan ekspresi TRP-1 berkaitan dengan peningkatan produksi sintesis melanin. Paparan iradiasi UVB terbukti menginduksi ekspresi gen TRP-1. Pada pemberian S-HMSCs ekspresi gen TRP-1 sangat berkurang secara tergantung dosis (Gambar 5.5). Hal ini menunjukkan bahwa S-HMSCs mengatur pigmentasi dengan memodulasi degradasi TRP-1.



Gambar 5.6. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA TRP-1 pada jaringan kulit masing-masing kelompok perlakuan. * Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ($p < 0.05$) dan # menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian S-HMSCs 100 μ L (13.16 $\pm$ 2.20) dan 200 μ L (1.96 $\pm$ 0.56) secara berturut-turut menurunkan ekspresi gen TRP-1 hingga 3.75 dan 25.18 kali lipat lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan UVB (49.36 $\pm$ 6.49). Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan ekspresi gen TRP-1 dibandingkan kontrol, namun pada dosis S-HMSCs 200 μ L tidak menunjukkan perbedaan signifikan jika dibandingkan kelompok sham (1.04 $\pm$ 0.02). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian S-HMSCs mampu menurunkan ekspresi gen TRP-1 setara dengan kondisi normal tanpa iradiasi UVB.

Tabel 5.3. Uji *Post-hoc* LSD ekspresi mRNA TRP-1 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sham	Kelompok UVB	0.000*	-59.3436	-37.3004
	Kontrol basis gel	0.000*	-50.5096	-28.4664
	P1	0.033*	-23.1416	-1.0984
	P2	0.864	-11.9416	10.1016
Kelompok UVB	Kontrol Basis gel	0.110	-2.1876	19.8556
	P1	0.000*	25.1804	47.2236
	P2	0.000*	36.3804	58.4236
Kontrol Basis gel	P1	0.000*	16.3464	38.3896
	P2	0.000*	27.5464	49.5896
P1	P2	0.047*	0.1784	22.2216

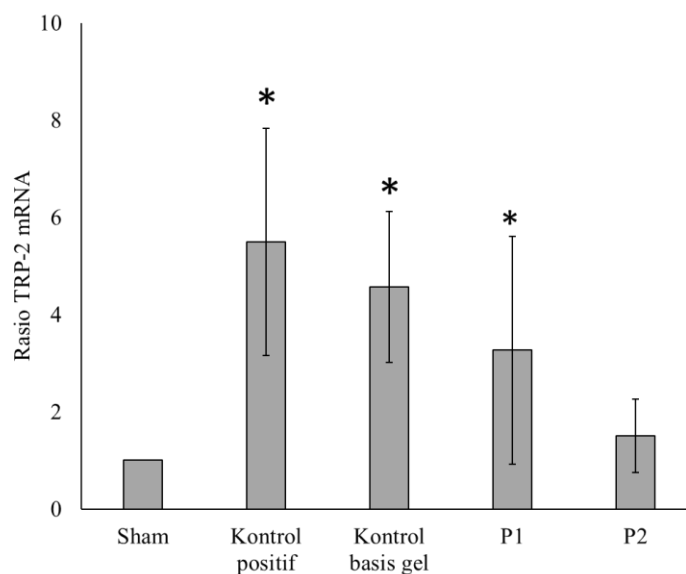
Uji *Post Hoc*:* mean difference significant $P < 0.05$

Pada data deskriptif ekspresi gen TRP-1 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. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan gel S-HMSCs dengan kelompok kontrol positif, kelompok basis gel, dan kelompok sham.

5.1.4. Efek Pemberian Gel S-HMSCs pada Ekspresi Gen TRP-2 pada Tikus

Model Hiperpigmentasi

Tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) adalah protein penting untuk yang berperan dalam sifat melanin dan albinisme. TRP-2 berbagi menjadi 40% identitas dengan tirosinase dan merupakan penanda utama untuk diferensiasi melanosit⁹³. TRP-2 berfungsi untuk merubah dopaquinone menjadi melanin melalui jalur eumelanin dan pheomelanin. Secara keseluruhan, TRP-1 dan TRP-2 adalah dua enzim penting yang terlibat dalam eumelanogenesis⁴⁰. Peningkatan ekspresi TRP-2 berkaitan dengan peningkatan produksi sintesis melanin. Paparan iradiasi UVB terbukti menginduksi ekspresi gen TRP-2. Pada pemberian S-HMSCs ekspresi gen TRP-2 sangat berkurang secara tergantung dosis (Gambar 5.6). Hal ini menunjukkan bahwa S-HMSCs mengatur pigmentasi dengan mendownregulasi ekspresi TRP-2.



Gambar 5.7. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA

TRP-2 pada jaringan kulit masing-masing kelompok perlakuan. * Menunjukkan

perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ($p < 0.05$) dan # menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Tabel 5.4. Uji *Post-hoc* LSD ekspresi mRNA TRP-2 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sham	Kelompok UVB	0.000*	-6.6093	-2.2667
	Kontrol basis gel	0.002*	-5.9393	-1.5967
	P1	0.045*	-4.3933	-0.0507
	P2	0.661	-2.6353	1.7073
Kelompok UVB	Kontrol Basis gel	0.527	-1.5013	2.8413
	P1	0.046*	0.0447	4.3873
	P2	0.001*	1.8027	6.1453
Kontrol Basis gel	P1	0.153	-0.6253	3.7173
	P2	0.005*	1.1327	5.4753
P1	P2	0.107	-0.4133	3.9293
Uji <i>Post Hoc</i> :		* mean difference significant $P < 0.05$		

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian S-HMSCs 100 μ L (3.27 ± 1.05) dan 200 μ L (1.51 ± 0.34) secara berturut-turut menurunkan ekspresi gen TRP-2 hingga 1.67 dan 3.63 kali lipat lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol kelompok UVB (5.48 ± 1.04). Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan ekspresi gen TRP-2 dibandingkan kontrol, namun pada dosis S-HMSCs 200 μ L tidak menunjukkan perbedaan signifikan jika dibandingkan kelompok sham (1.04 ± 0.01). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian S-HMSCs mampu menurunkan ekspresi gen TRP-2 setara dengan kondisi normal tanpa iradiasi UVB.

Pada data deskriptif ekspresi gen TRP-2 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 5.6 dan tabel 5.4. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan gel S-HMSCs dengan kelompok kontrol positif, kelompok basis gel, dan kelompok sham.

5.2. Pembahasan

Paparan iradiasi UVB adalah faktor resiko utama fotoaging kulit yang berakibat hiperpigmentasi, ditandai dengan peningkatan ekspresi protein pembentuk melanin seperti MITF, TRP-1, dan TRP-2⁸⁷. Iradiasi sinar UVB menginduksi kerusakan DNA melalui pembentukan ROS oksidatif, yang mengakibatkan aktivasi beberapa jalur sintesis melanin⁹⁴. Terapi saat ini tidak semuanya memberikan hasil maksimal terutama dalam mencegah hiperpigmentasi kulit, beberapa agen menimbulkan efek samping merugikan seperti genotoksisitas dan iritasi kulit⁹. Penelitian terkini membuktikan bahwa hipoksik sekretom *Mesenchymal Stem Cells* (S-HMSCs) mengandung *soluble molecule* bioaktif seperti *growth factor* dan sitokin anti-inflamasi yang mampu memperbaiki dan menginduksi regenerasi kulit⁶⁹. S-HMSCs mengandung senyawa seperti IL-10, IL-12, HGF, TGF- β , VEGF, PDGF, dan FGF⁹⁵⁻⁹⁷. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi dosis S-HMSCs dalam bentuk sediaan gel terhadap ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-2 yang berperan dalam jalur sintesis melanin

pada tikus model hiperpigmentasi. Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar karena termasuk vertebrata mamalia dengan struktur kulit mirip kulit manusia. Hewan uji di induksi paparan sinar UVB 302 nm dengan intensitas energi 390mJ/cm^2 sebanyak tiga kali seminggu selama 2 minggu ⁸⁷.

Penelitian ini melakukan pengukuran ekspresi gen MITF, MITF adalah protein pengatur utama melanosit, memainkan peran kunci dalam perkembangan, diferensiasi, fungsi, dan proliferasi sel melanosit ⁵⁸. Pada penelitian ini didapatkan bahwa terdapat penurunan ekspresi gen MITF secara signifikan pada perlakuan dosis S-HMSCs 100 μL dan 200 μL . TGF- β yang terkandung dalam S-HMSCs menghambat aktivitas MITF melalui penghambatan jalur PI3K/Akt ⁹⁸. TGF- β berpotensi menghambat biosintesis melanin pada sel melanoma B16. Penurunan aktivitas MITF terbukti bertanggung jawab pada penurunan kandungan pigmen kulit dengan mendegradasi TRP-1 ^{39,87}. TGF- β juga telah dilaporkan dapat menghambat jalur cAMP / protein kinase A dan menginduksi GLI2, yang kemudian menekan MITF, faktor transkripsi sentral melanogenesis ⁵⁵. Sedangkan melalui jalur SMAD, TGF- β dalam menghambat proses melanogenesis dengan mengirimkan sinyal melalui reseptor heteromerik spesifik ligan, yaitu reseptor serin/treonin kinase yang berfungsi untuk fosforilasi dan aktivasi reseptor (R)-Smad, yang mengarah ke pembentukan kompleks dengan (Co)-Smad, Smad4, dan regulasi transkripsi dari gen target sehingga menekan ekspresi MITF ²². IL-10 dari secretom juga mampu menghambat MITF melalui inhibisi PI3K/Akt pathway ⁹⁸.

Pada penelitian ini terjadi fenomena yang sama dengan penelitian sebelumnya bahwa kandungan TGF- β yang lebih banyak pada dosis gel S-HMSCs

200 μ L menunjukkan penurunan ekspresi gen MITF hingga 1.96 ± 0.56 pada bagian epidermis kulit yang lebih besar dibandingkan dengan dosis gel S-HMSCs 100 μ L (2.95 ± 0.72). Penelitian ini lebih lanjut menunjukkan efek penghambatan gel S-HMSCs pada ekspresi gen TRP-1 dan TRP-2.

Ekspresi TRP-1 dan TRP-2 berkorelasi dengan aktivasi jalur pembentukan eumelanin dan pheomelanin. Peningkatan ekspresi TRP-1 yang berlebihan dapat menyebabkan kondisi hiperpigmentasi seperti perubahan patologis terjadi melasma, bintik-bintik, warna kulit tidak rata dan lentigo matahari ³⁹. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa peningkatan ekspresi TRP-1 berkorelasi dengan peningkatan jumlah melanin akibat iradiasi UVB. Namun, peningkatan ekspresi TRP-2 berkaitan dengan proliferasi sel melanoma ⁹⁹. Pada penelitian ini pemberian S-HMSCs secara signifikan dan tergantung dosis menurunkan ekspresi gen TRP-1 dan TRP-2. Pada pemberian dosis S-HMSCs 200 μ L dapat menurunkan ekspresi gen TRP-1 (1.96 ± 0.56) dan TRP-2 (1.51 ± 0.34) hingga tidak berbeda signifikan dengan kelompok sham TRP 1 (1.04 ± 0.01) dan kelompok sham TRP-2 (1.04 ± 0.01). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian S-HMSCs dapat mencegah hiperpigmentasi melalui downregulasi ekspresi TRP-1 dan TRP-2. Penurunan ekspresi TRP-1 dan TRP-2 menyebabkan DOPA-quinone tidak berubah menjadi eumelanin ¹⁰⁰. Sitokin antiinflamasi IL-10 yang terkandung dalam S-HMSCs dapat mencegah pembentukan melanin ¹⁰¹. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa setelah treatment dengan IL-17 dan TNF pada sel melanosit selama 24-48 jam, kadar MITF, TRP-2, dan kadar tyrosinase menurun sehingga menyebabkan jumlah melanin berkurang secara signifikan ¹⁰². Kombinasi antara IL-17 dan TNF dapat

menghambat melanogenesis melalui jalur pensinyalan PKA dan MAPK ²⁴. Hal ini menunjukkan bahwa S-HMSCs memiliki potensi untuk mengobati hiperpigmentasi.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pengobatan sel melanoma dengan IL-1 β , menyebabkan penghambatan ekspresi MITF melalui aktivasi jalur NF- κ B dan JNK. Inaktivasi kedua jalur ini dapat menghilangkan efek penghambatan IL-1 β pada melanin, yang menunjukkan bahwa IL-1 β dapat menurunkan regulasi MITF melalui jalur NF- κ B dan JNK, sehingga menghambat melanogenesis ²⁴. Disisi lain oksidatif stress (ROS) adalah penyebab utama hiperpigmentasi yang menginduksi pelepasan ekspresi protein pengatur sintesis melanin seperti MITF, TRP-1, dan TRP-2 ^{45,103}. *Growth factor* seperti *hepatocyte growth factor* (HGF) dilaporkan dapat melindungi kerusakan berbagai jaringan dengan mencegah ROS. VEGF juga mencegah kerusakan sel keratinosit dengan menghambat stress oksidatif pada tikus ¹⁰⁴. Irradiasi sinar UVB menyebabkan apoptosis sel kulit melalui induksi kerusakan DNA yang berkorelasi dengan penurunan produksi kolagen dan peningkatan sintesis melanin ⁴⁹. Conditioned medium adipose stem cells yang mengandung sitokin anti inflamasi dan *growth factor* terbukti mencegah kematian sel yang di induksi UVB melalui pencegahan siklus sel *arrest* di fase Sub-G1 ¹⁰⁴.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukan bahwa senyawa S-HMSCs memiliki aktivitas antihiperpigmentasi pada model tikus hiperpigmentasi melalui penurunan ekspresi gen MITF, TRP-1, dan TRP-2. Hal ini menunjukkan bahwa S-HMSCs memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai terapi yang tertarget pada hiperpigmentasi kulit.

5.3. Kelemahan Penelitian

Kelamahan penelitian ini adalah tidak mengeksplorasi efek pemberian S-HMSCs terhadap kadar ROS intraseluler yang diduga secara kuat sebagai salah satu faktor penyebab kerusakan jaringan akibat paparan sinar UVB. Aktivasi ROS dalam menginduksi ekspresi MITF, TRP-1, dan TRP-2 pada sel melanosit melalui jalur NF- κ B, MAPK, dan JNK juga tidak diamati pada penelitian ini. Penelitian ini juga tidak mengamati aktivitas secara molekuler yang terjadi pada sel melanosit secara *in vivo*.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian gel S-HMSCs dosis 100 μ L dan 200 μ L berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi gen MITF pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.
2. Terdapat penurunan ekspresi gen TRP-1 pada epidermis kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB yang lebih banyak pada pemberian gel S-HMSCS dosis 200 μ L dibandingkan dosis 100 μ L dan kelompok UVB.
3. Terdapat penurunan ekspresi gen TRP-2 pada epidermis kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB yang lebih banyak pada pemberian gel S-HMSCS dosis 200 μ L dibandingkan dosis 100 μ L dan kelompok UVB.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian gel S-HMSCs pada tikus model hiperpigmentasi.
2. Perlu pengamatan aktivasi jalur NF-kB, MAPK, dan JNK setelah dilakukan pemberian gel S-HMSCs pada tikus model hiperpigmentasi.

3. Perlu pengukuran pengamatan mekanisme molekuler pemberian S-HMSCs secara *in vivo* pada sel melanosit.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Kim MR, Lee HS, Choi HS, Kim SY, Park Y, Suh HJ. Protective effects of ginseng leaf extract using enzymatic extraction against oxidative damage of UVA-irradiated human keratinocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; **173**: 933–945.
- 2 Alam MB, Bajpai VK, Lee JI, Zhao P, Byeon JH, Ra JS *et al*. Inhibition of melanogenesis by jineol from *Scolopendra subspinipes mutilans* via MAP-Kinase mediated MITF downregulation and the proteasomal degradation of tyrosinase. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–12.
- 3 Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: Biology and development. *Postep Dermatologii i Alergol* 2013; **30**: 30–41.
- 4 Slominski A. L-tyrosine and L-DOPA as hormone-like regulators of melanocytes functions. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; **72**: 181–204.
- 5 Choi H, Choi H, Han J, Jin SH, Park JY, Shin DW *et al*. IL-4 inhibits the melanogenesis of normal human melanocytes through the JAK2-STAT6 signaling pathway. *J Invest Dermatol* 2013; **133**: 528–536.
- 6 Virador VM, Kobayashi N, Matsunaga J, Hearing VJ. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Anal Biochem* 1999; **270**: 207–219.
- 7 Sarkar R, Bhalla M, Kanwar AJ. A comparative study of 20% azelaic acid cream monotherapy versus a sequential therapy in the treatment of melasma in dark-skinned patients. *Dermatology* 2002; **205**: 249–254.
- 8 Baliña LM, Graupe K. The Treatment of Melasma 20% Azelaic Acid versus

- 4% Hydroquinone Cream. *Int J Dermatol* 1991; **30**: 893–895.
- 9 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; **14**: 87–105.
 - 10 García-Gavín J, González-Vilas D, Fernández-Redondo V, Toribio J. Pigmented contact dermatitis due to kojic acid. A paradoxical side effect of a skin lightener. *Contact Dermatitis* 2010; **62**: 63–64.
 - 11 Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *Eur J Pain (United Kingdom)* 2019; **23**: 874–883.
 - 12 Murniastuti DS, Etnawati K, Pudjiati SR. The correlation between severity of melasma with facial wrinkles in Yogyakarta, Indonesia. *Dermatology Reports* 2020; **12**: 40–42.
 - 13 Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Ebell M, Epling JW *et al*. Screening for skin cancer US preventive services task force recommendation statement. *JAMA - J Am Med Assoc* 2016; **316**: 429–435.
 - 14 Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; **4**: 551–579.
 - 15 Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *J Biomed Technol Res* 2014; **1**: 1–21.
 - 16 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.
- 17 Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2001; **280**: 1196–1202.
 - 18 Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 β maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–15.
 - 19 English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013; **91**: 19–26.
 - 20 Abreu SC, Weiss DJ, Rocco PRM. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: A therapeutic option in respiratory diseases? *Stem Cell Res Ther* 2016; **7**: 1–10.
 - 21 Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 1482–1491.
 - 22 Pierrat MJ, Marsaud V, Mauviel A, Javelaud D. Expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is critical for melanoma progression, is inhibited by both transcription factor GLI2 and transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 2012; **287**: 17996–18004.
 - 23 Ballotti R, Cheli Y, Bertolotto C. The complex relationship between MITF and the immune system: a Melanoma ImmunoTherapy (response) Factor?

- Mol Cancer* 2020; **19**: 1–12.
- 24 Fu C, Chen J, Lu J, Yi L, Tong X, Kang L *et al.* Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol Med Rep* 2020; **21**: 1421–1430.
 - 25 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. *Mol Ther* 2018; **26**: 606–617.
 - 26 Robert AW, Azevedo Gomes F, Rode MP, Marques da Silva M, Veleirinho MB da R, Maraschin M *et al.* The skin regeneration potential of a pro-angiogenic secretome from human skin-derived multipotent stromal cells. *J Tissue Eng* 2019; **10**. doi:10.1177/2041731419833391.
 - 27 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. *J Cosmet Dermatological Sci Appl* 2017; **07**: 99–117.
 - 28 Salehi B, Machin L, Monzote L, Sharifi-Rad J, Ezzat SM, Salem MA *et al.* Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega* 2020; **5**: 11849–11872.
 - 29 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; **38**: 164.
 - 30 Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006; **12**: 406–414.

- 31 Hartman ML, Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma. *J Invest Dermatol* 2015; **135**: 352–358.
- 32 Oh TI, Yun JM, Park EJ, Kim YS, Lee YM, Lim JH. Plumbagin suppresses α -MSH-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells by inhibiting tyrosinase activity. *Int J Mol Sci* 2017; **18**. doi:10.3390/ijms18020320.
- 33 Padhi S, Sarangi RL, Ramdas A, Ravichandran K, Varghese RGB, Alexander T *et al*. Cutaneous hyperpigmentation in megaloblastic anemia: A five year retrospective review. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016; **8**. doi:10.4084/MJHID.2016.021.
- 34 Chen T, Zhao B, Liu Y, Wang R, Yang Y, Yang L *et al*. MITF-M regulates melanogenesis in mouse melanocytes. *J Dermatol Sci* 2018; **90**: 253–262.
- 35 Villareal MO, Kume S, Neffati M, Isoda H. Upregulation of Mitf by Phenolic Compounds-Rich Cymbopogon schoenanthus Treatment Promotes Melanogenesis in B16 Melanoma Cells and Human Epidermal Melanocytes. *Biomed Res Int* 2017; **2017**. doi:10.1155/2017/8303671.
- 36 Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important for Melanogenesis. *Angew Chemie - Int Ed* 2017; **56**: 9812–9815.
- 37 Milac AL, Negroiu G. The Multiple Roles of Tyrosinase-Related Protein-2/L- Dopachrome Tautomerase in Melanoma: Biomarker, Therapeutic Target, and Molecular Driver in Tumor Progression. *Hum Ski Cancers - Pathways, Mech Targets Treat* 2018. doi:10.5772/intechopen.70513.

- 38 Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol* 2018; **98**: 924–931.
- 39 Kim SS, Kim MJ, Choi YH, Kim BK, Kim KS, Park KJ *et al.* Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; **3**: 617–622.
- 40 Tuerxuntayi A, Liu Y qiang, Tulake A, Kabas M, Eblimit A, Aisa HA. Kaliziri extract upregulates tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in murine B16 melanoma cells. *BMC Complement Altern Med* 2014; **14**: 1–9.
- 41 Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 2006; **55**: 1–19.
- 42 Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol* 2019; **28**: 23–27.
- 43 Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; **5**: 1–14.
- 44 Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol* 2013; **2013**: 1–11.
- 45 Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs* 2008; **20**.
- 46 Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *Int J Cosmet Sci* 2008; **30**: 87–95.

- 47 Hwang K-A, Yi B-R, Choi K-C. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations . *Lab Anim Res* 2011; **27**: 1.
- 48 Olusegun A, Makun HA, Ogara IM, Edema M, Idahor KO, Oluwabamiwo BF *et al.* We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech* 2012; **i**: 38.
- 49 Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 8962–8968.
- 50 Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007; **445**: 843–850.
- 51 Zhao H, Chen M, Yang H. Albinism. *Dev Aquac Fish Sci* 2015; **39**: 211–228.
- 52 Eichner A, Hänsel M, Domino KB, Hübler M. Mechanisms regulating melanogenesis. *Complicat Mishaps Anesth Cases - Anal - Prev Strateg* 2014; **9783642454**: 233–242.
- 53 Vance KW, Goding CR. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res* 2004; **17**: 318–325.
- 54 Xu W, Gong L, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Yeh ETH *et al.* Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res* 2000; **255**: 135–143.
- 55 Lee SE, Park SH, Oh SW, Yoo JA, Kwon K, Park SJ *et al.* Beauvericin inhibits melanogenesis by regulating cAMP/PKA/CREB and LXR- α /p38

- MAPK-mediated pathways. *Sci Rep* 2018; **8**: 1–12.
- 56 Hong Y, Song B, Chen HD, Gao XH. Melanocytes and skin immunity. *J Investig Dermatology Symp Proc* 2015; **17**: 37–39.
- 57 Nishio T, Usami M, Awaji M, Shinohara S, Sato K. Dual effects of acetylsalicylic acid on ERK signaling and Mitf transcription lead to inhibition of melanogenesis. *Mol Cell Biochem* 2016; **412**: 101–110.
- 58 Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015; **28**: 390–406.
- 59 Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; **13**: 460–469.
- 60 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.
- 61 Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D Syst* 2018.<https://resources.rndsystems.com/images/site/wp-msc-13763.pdf%0Ahttps://www.rndsystems.com/resources/articles/markers-and-methods-verify-mesenchymal-stem-cell-identity-potency-and-quality>.
- 62 Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focus Tumor Microenviron Stem cells Metastasis* 2011. doi:10.5772/21325.

- 63 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.
- 64 Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014; : 135–156.
- 65 Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Reports* 2016; **2**: 168–173.
- 66 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.
- 67 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.
- 68 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.
- 69 Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells* 2019; **8**: 467.
- 70 Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 552.
- 71 Wang L, Qin W, Zhou Y, Chen B, Zhao X, Zhao H *et al*. Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by

- topical application of Povidone-iodine. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–8.
- 72 Kevin Range and DMYAM. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* 2012; **23**: 1–7.
- 73 Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al.* Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *J Formos Med Assoc* 2017; **116**: 351–358.
- 74 Yang H, Li G, Wu JJ, Wang L, Uhler M, Simeone DM. Protein kinase a modulates transforming growth factor- β signaling through a direct interaction with Smad4 protein. *J Biol Chem* 2013; **288**: 8737–8749.
- 75 Shoma Suresh K, Bhat S, Guru BR, Muttigi MS, Seetharam RN. A nanocomposite hydrogel delivery system for mesenchymal stromal cell secretome. *Stem Cell Res Ther* 2020; **11**: 1–14.
- 76 Waters R, Alam P, Pacelli S, Chakravarti AR, Rafeeq PH, Paul A *et al.* HHS Public Access. 2019; : 95–106.
- 77 Maxey J. AADE-11-NTCE-23 Viscosity and Gel Structure : The Unseen Results of Their Manipulation. 2011.
- 78 Trostyanskaya YB, Makarova SB, Aptova TA, Murashko IN. Hydrophobic and hydrophilic gels of various permeabilities prepared by copolymerization of styrene with p-divinylbenzene. *Polym Sci USSR* 1965; **7**: 2282–2289.
- 79 Cabral MES, Ramos AN, Macedo AJ, Trentin DS, Treter J, Manzo RH *et al.* Formulation and quality control of semi-solid containing harmless bacteria

- by-products: Chronic wounds pro-healing activity. *Pharm Dev Technol* 2015; **20**: 911–918.
- 80 Nair A, Jacob S, Al-Dhubiab B, Attimarad M, Harsha S. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Brazilian J Pharm Sci* 2013; **49**: 423–434.
- 81 Xie WJ, Zhang YP, Xu J, Sun XB, Yang FF, Kalia Y. The effect and mechanism of transdermal penetration enhancement of Fu's cupping therapy: New physical penetration technology for transdermal administration with Traditional Chinese Medicine (TCM) characteristics. *Molecules* 2017; **22**. doi:10.3390/molecules22040525.
- 82 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; **105**: 1815–1822.
- 83 Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2015; **63**: 435–449.
- 84 Ding L, Azam M, Lin YH, Sheridan J, Wei S, Gupta G *et al*. Generation of high-affinity fully human anti-interleukin-8 antibodies from its cDNA by two-hybrid screening and affinity maturation in yeast. *Protein Sci* 2010; **19**: 1957–1966.
- 85 Tanaka K, Asamitsu K, Uranishi H, Iddamalgoda A, Ito K, Kojima H *et al*. Protecting Skin Photoaging by NF- κ B Inhibitor. *Curr Drug Metab* 2010; **11**: 431–435.
- 86 Cui S, Wang J, Wu Q, Qian J, Yang C, Bo P. Genistein inhibits the growth

- and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways. *Oncotarget* 2017; **8**: 21674–21691.
- 87 You YJ, Wu PY, Liu YJ, Hou CW, Wu CS, Wen KC *et al.* Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin. *Antioxidants* 2019; **8**: 1–16.
 - 88 Al-Azzawi B, Mcguigan DH, Manderson Koivula FN, Elttayef A, Dale TP, Yang Y *et al.* The Open Stem Cell Journal The Secretome of Mesenchymal Stem Cells Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism. 2020; **6**: 1–12.
 - 89 Ueha S, Shand FHW, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol* 2012; **3**: 1–6.
 - 90 Rong X, Li J, Yang Y, Shi L, Jiang T. Human fetal skin-derived stem cell secretome enhances radiation-induced skin injury therapeutic effects by promoting angiogenesis. *Stem Cell Res Ther* 2019; **10**: 1–11.
 - 91 Sunarto H, Trisnadi S, Putra A, Sa'dyah NAC, Tjipta A, Chodidjah C. The Role of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing. *Indones J Cancer Chemoprevention* 2020; **11**: 134.
 - 92 Lapedriza A, Petratos K, Kelsh RN. Neural Crest Cells and Pigmentation. *Neural Crest Cells Evol Dev Dis* 2014; : 287–311.
 - 93 Xue L, Li Y, Zhao B, Chen T, Dong Y, Fan R *et al.* TRP-2 mediates coat

- color pigmentation in sheep skin. *Mol Med Rep* 2018; **17**: 5869–5877.
- 94 Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci* 2018; **210**: 201–208.
- 95 Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 2018; **217**. doi:10.1083/jcb.201708007.
- 96 Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; **174**: 299–306.
- 97 Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol* 2017; **92**: 356–362.
- 98 Comi M, Amodio G, Gregori S. Interleukin-10-producing DC-10 is a unique tool to promote tolerance via antigen-specific T regulatory type 1 cells. *Front Immunol* 2018; **9**: 1–8.
- 99 Nishioka E, Funasaka Y, Kondoh H, Chakraborty AK, Mishima Y, Ichihashi M. Expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes: TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis. *Melanoma Res.* 1999; **9**: 433–443.
- 100 Reja AH, De A, Biswas S, Chattopadhyay A, Chatterjee G, Bhattacharya B *et al.* Use of fine needle aspirate from peripheral nerves of pure-neural leprosy for cytology and PCR to confirm the diagnosis: A pilot study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2013; **79**: 789–794.

- 101 Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herlyn M. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer* 1994; **56**: 853–857.
- 102 Wang CQF, Akalu YT, Suarez-Farinas M, Gonzalez J, Mitsui H, Lowes MA *et al.* IL-17 and TNF synergistically modulate cytokine expression while suppressing melanogenesis: Potential relevance to psoriasis. *J Invest Dermatol* 2013; **133**: 2741–2752.
- 103 Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *Sparganium angustifolium* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; **11**. doi:10.3390/nu11061341.
- 104 Chen S, He Z, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in photoaging: basic science and literature review. *Stem Cell Res Ther* 2020; **11**: 1–15.