

**PENGARUH SECRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL
STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI SOD DAN MMP-1
TIKUS MODEL HYPERPIGMENTASI
(Studi Eksperimental Tikus Galur Wistar Model Hiperpigmentasi
yang Dipapar Sinar UV-B)**

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S2



Disusun Oleh:
Zukhiroh
MBK 2015010191

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2022**

TESIS

**PENGARUH SECRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELLS
TERHADAP EKSPRESI SOD DAN MMP-1 TIKUS MODEL
HYPERPIGMENTASI**

**(Studi In Vivo Pada Tikus Galur Wistar Model Hiperpigmentasi Yang
Dipapar Sinar UVB)**

Disusun Oleh:

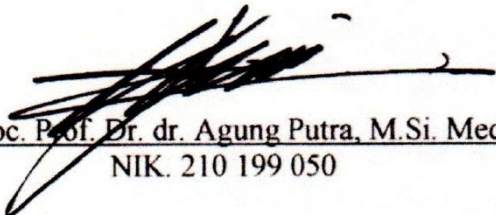
Zukhiroh

MBK 2015010191

akan dipertahankan didepan Tim Penguji
Pada tanggal 06 April 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk di terima

Telah Disetujui Oleh :

Pembimbing I

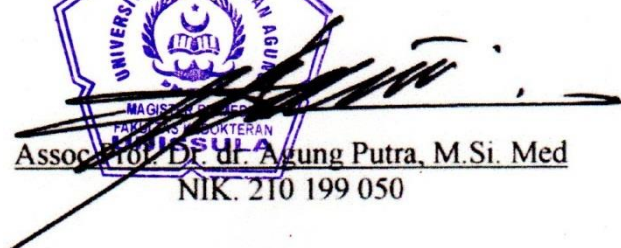

Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210 199 050

Pembimbing II


Dr. dr. Chodidjah, M.Kes.
NIK. 210 186 023

Mengetahui,

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



Assoc. 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 kesarjanaan 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, 18 April 2022

Yang menyatakan,



(Zukhiroh)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Zukhiroh
Tempat, tanggal lahir : Pekalongan, 07 September 1969
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN 1 Tirto Pekalongan : lulus tahun 1983
2. SMPN 1 Pekalongan : lulus tahun 1985
3. SMAN Wiradesa Pekalongan : lulus tahun 1988
4. FK UNISSULA Semarang : lulus tahun 2000
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2020 – sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2000-2015 : RSUD Kraton Pekalongan
2. Tahun 2015-2018 : RSMB Pati
3. Tahun 2018-sekarang : RSUD Ki Ageng Selo Wirosari, Grobogan

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : H. Maskun
Ibu : Hj. Alfi Mahdiah
2. Nama Suami : -
3. Nama Anak :
 1. Firdina Aprilia
 2. Jihan Qanita Yuniatifa
 3. Faiq Haidar Habibi
 4. Daniyal Fiqi Rahman

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas berkat dan rahmat-Nya, sehingga tesis dengan judul, **“Pengaruh Secretome Hipoksia Mesenchymal Stem Cells Terhadap Ekspresi SOD dan MMP-1 Tikus Model Hyperpigmentasi: Studi Eksperimental Tikus Galur Wistar Model Hyperpigmentasi yang Dipapar Sinar UV-B”** ini dapat terselesaikan.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

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

5. Seluruh staf dan dosen di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
6. Keluarga tercinta, anak-anak kebanggaan, serta seluruh keluarga besar, Terimakasih atas doa dan dukungannya.
7. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Research) Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah membantu secara teknis dalam penelitian tesis saya.
8. Teman-teman satu tim penelitian saya, Zahara Kurniawati dan Yunita Ika Mayasari, terimakasih sudah membantu dalam perancangan dan diskusi selama penelitian.
9. Teman-teman seangkatan Biomedik UNISSULA yang baik, dan yang sudah membantu saat saya dan yang sering saya “ribeti” dengan ketidaktahuan saya.
10. 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, Maret 2022

Zukhiroh

ABSTRAK

Latar belakang: Radiasi UVB merupakan faktor utama penyebab hiperpigmentasi. sekretom MSC mengandung *soluble molecule* bioaktif seperti sitokin dan factor pertumbuhan yang mampu mempercepat regenerasi kulit. Namun, peran sekretom secara molekuler terhadap hiperpigmentasi hingga saat ini masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel S-HMSC terhadap ekspresi gen SOD dan MMP-1 pada jaringan kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.

Metode: Penelitian eksperimental dengan post test control group. Kelompok UVB, Sham, Base gel, P1 dan P2 masing-masing dipapar UVB selama 6 kali dalam 14 hari dengan 302 nm dengan MED 390 mJ/cm², sedangkan UVB tidak menerima paparan UVB. Pada P1 diberi gel S-HMSC 100 uL dan P2 diberi gel S-HMSC 200 uL setiap hari selama 14 hari, sedangkan Base gel menerima base gel. Pada hari ke 15 dilakukan, jaringan kulit disiolasi dan dianalisis ekspresi SOD dan MMP-1 menggunakan qRT-PCR.

Hasil: Ekspresi relative gen SOD pada kelompok perlakuan mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan dosis pemberian (P1=0.47±0.20, P2=1.22±0.47) dibandingkan dengan kelompok UVB (UVB=0.05±0.01, Base gel=0.05±0.02). Ekspresi relative gen MMP-1 pada kelompok perlakuan mengalami penurunan seiring dengan peningkatan dosis pemberian (P1=5.82±1.16, P2=2.86±1.57) dibandingkan dengan kelompok control (UVB=10.10±2.31, Base gel=9.55±1.29).

Kesimpulan: Pemberian gel S-HMSC dapat meningkatkan ekspresi gen SOD dan menurunkan ekspresi gen MMP-1 pada jaringan kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

Kata Kunci: Secretome, SOD, MMP-1, hiperpigmentasi, qRT-PCR.

ABSTRACT

Background: UVB radiation is the main factor causing hyperpigmentation. MSC secretome contains bioactive soluble molecules such as cytokines and growth factors that can accelerate skin regeneration. However, the molecular role of the secretome in hyperpigmentation is still unclear. This study aimed to determine the effect of S-HMSC gel on the expression of SOD and MMP-1 genes in skin tissue of hyperpigmented mice induced by UVB light exposure.

Methods: Experimental research with post test control group. The Control, Base gel, T1 and T2 groups were UVB irradiated 6 times in 14 days at 302 nm with an MED of 390 mJ/cm², respectively, while Sham group did not receive UVB exposure. T1 was given 100 uL of S-HMSC gel and T2 was given 200 uL of S-HMSC gel every day for 14 days, while Base gel received base gel. On day 15, skin tissue was isolated and analyzed for SOD and MMP-1 expression using qRT-PCR.

Results: The relative expression of the SOD gene in the treatment group (P1=0.47±0.20, P2=1.22±0.47) increased with increasing dose compared to the control group (UVB=0.05±0.01, Base gel=0.05±0.02). The relative expression of the MMP-1 gene in the treatment group (T1= 5.82±1.16, T2= 2.86±1.57) decreased with increasing dose compared to the control group (Control=10.10±2.31, Base gel=9.55±1.29).

Conclusion: Administration of S-HMSC gel can increase SOD gene expression and decrease MMP-1 gene expression in skin tissue of hyperpigmented mice model induced by UVB light.

Keywords: Secretome, SOD, MMP-1, hyperpigmentation, qRT-PCR.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	xiv
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat penelitian	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Superoxide Dismuthase (SOD)	8
2.1.1. Definisi SOD.....	8
2.1.2. Mekanisme Antioksidan SOD	8
2.2. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1).....	10
2.2.1. Definisi MMP-1.....	10
2.2.2. Peran MMP-1.....	10
2.3. Hiperpigmentasi	12
2.3.1. Definisi	12

2.3.2. Proses Hiperpigmentasi	12
2.4. Melanin.....	14
2.4.1. Definisi melanin.....	14
2.4.2. Mekanisme Sintesis Melanin.....	16
2.5. Mekanisme Induksi ROS dan MMP-1 akibat Induksi UVB.....	19
2.6. Mesenchymal Stem Cells (MSCs).....	20
2.6.1. Definisi MSCs.....	20
2.6.2. Sumber MSCs.....	21
2.6.3. Karakteristik MSCs.....	21
2.6.4. Peran MSCs	22
2.7. Hipoksia.....	23
2.8. Sekretom MSCs.....	23
2.9. Pengaruh S-HMSC terhadap ekspresi gen SOD dan MMP-1	24
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	27
3.1. Kerangka Teori.....	27
3.2. Kerangka Konsep	29
3.3. Hipotesis.....	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	30
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	31
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	33
4.4. Alat dan Bahan	35
4.4.1. Alat	35
4.4.2. Bahan.....	35
4.5. Cara Penelitian.....	36
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	36
4.5.2. Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	36
4.5.3. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i>	37
4.5.4. Proses Hipoksia	38

4.5.5.	Pembuatan Sediaan Gel.....	39
4.5.6.	Pembuatan Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan.....	39
4.5.7.	Terminasi dan pengambilan jaringan.....	40
4.5.8.	Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA	40
4.5.9.	Pembacaan SOD dan MMP-1 dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	42
4.6.	Tempat dan Waktu Peneltian.....	43
4.7.	Analisa Data	43
4.8.	Alur Penelitian.....	44
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		45
5.1.	Hasil Penelitian.....	46
5.1.1.	Isolasi Secretome <i>Mesenchymal Stem Cell</i> Hipoksia (S-HMSC) ..	46
5.1.1.	Efek Pemberian Gel S-HMSC Pada Ekspresi SOD Tikus Model Hiperpigmentasi.....	49
5.1.2.	Efek Pemberian Gel S-HMSC Pada Ekspresi MMP-1 Tikus Model Hiperpigmentasi.....	51
5.2.	Pembahasan	53
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		57
6.1.	Kesimpulan.....	58
6.2.	Saran	58
DAFTAR PUSTAKA		59
LAMPIRAN		67
Lampiran 1. Ethical Clearance		67
Lampiran 2. Analisis Statistik		68
Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan.....		72

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>
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	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>

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>
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</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
S-HMSC	: <i>Secretome - Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
Smad	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismuthase</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>
UVB	: <i>Ultra Violet B</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Mekanisme keseimbangan redoks di kulit	9
Gambar 2.2. Skema degradasi kolagen akibat paparan sinar UVB	14
Gambar 2.3. Skema kaskade transuksi sinyal melanogenesis	16
Gambar 2.4. Sumber <i>mesenchymal stem cell</i> (MSCs)	21
Gambar 2.5. Kemampuan diferensiasi dari MSCs.....	22
Gambar 2.6. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs.....	23
Gambar 2.7. Diagram skema TGF- β 1 meningkatkan akumulasi kolagen melalui penghambatan MMP dan stimulasi sintesis kolagen	26
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	28
Gambar 3.2. Kerangka konsep.....	29
Gambar 4.1. Gambar rancangan penelitian.....	30
Gambar 4.2. Alur penelitian.....	44
Gambar 5.1. Validasi MSC	46
Gambar 5.2. Analisis <i>flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31	47
Gambar 5.3. Hasil RT-PCR menunjukkan tingkat ekspresi mRNA SOD pada jaringan kulit masing-masing kelompok	48
Gambar 5.4. Hasil RT-PCR menunjukkan tingkat ekspresi mRNA MMP-1 pada jaringan kulit masing-masing kelompok	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i>	37
Tabel 5.1. Data Hasil Penelitian Ekspresi SOD dan MMP-1.....	49
Tabel 5.2. Uji <i>Post-hoc</i> LSD ekspresi SOD dan MMP-1 antar kelompok penelitian.....	51

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 melanin dan *wrinkle* pada kulit¹. Induksi UVB menginduksi peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) sehingga mempercepat proses penuaan kulit, meningkatkan proliferasi melanosit, dan sintesis melanin². Overekspresi ROS menyebabkan abnormalitas *activator-protein 1* (AP-1) yang menghambat sintesis kolagen melalui pelepasan enzim matriks metalloproteinase (MMPs) termasuk MMP-1 sehingga menghambat sintesis kolagen^{3,4}. Enzim antioksidan *extracellular superoxide dismutase* (SOD) memiliki peran sentral dalam menekan kadar ROS abnormal^{5,6}. SOD juga sebagai satu faktor utama yang mengurangi produksi melanin akibat iradiasi UVB⁷.

Paparan berulang UVB diketahui menyebabkan efek merugikan untuk kulit manusia, termasuk menyebabkan kanker, immunosupresif, eritema, dan hiperpigmentasi akibat mutasi onkogen dan gen penekan tumor^{5,8}. Pada tahun 2015 sebanyak 4.2% dari 142 subjek positif mengalami hiperpigmentasi setelah terpapar tiga kali *minimal erythema dose* (MED) UVB⁹. Paparan UVB menyebabkan 8% kejadian karsinoma skuamosa yang dikenal dengan kanker kulit melanoma dengan potensi metastasis tinggi^{10,11}. Kejadian melanoma meningkat pada tahun 2020 dengan ~100.350 kasus

baru dan 6.850 kasus kematian¹². Jenis sel melanoma primer yang dikultur 40-60% nya menunjukkan peningkatan ekspresi ROS¹³. Peningkatan ROS menginduksi pelepasan MMPs diantaranya MMP-1, MMP-2, dan MMP-9 untuk memecah protein *extracellular matrix* (ECM) seperti kolagen, fibronectin, elastin, proteoglycans yang berperan pada *photoaging*^{14,15}.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa interleukin-10 (IL-10) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dapat menekan kadar ROS melalui jalur *nuclear factor kappa- β* (NF- κ B)^{16,17}. Secretom *hypoxia mesenchymal stem cells* (S-HMSC) banyak mengandung sitokin seperti interleukin-10 (IL-10), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) dan *growth factor* seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β), VEGF, *Platet Derived Growth Factor* (PDGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)^{18,19} yang dapat mencegah hiperpigmentasi UVB melalui penekanan jumlah melanin dan peningkatan kadar kolagen²⁰. *Soluble molecule* S-HMSC termasuk IL-10 dan TGF- β terbukti mampu mengendalikan kerusakan kulit akibat radiasi sinar UVB menurunkan kadar ROS²¹, menghambat pembentukan melanin dan menurunkan inflamasi^{22,23}. Keunggulan pemberian S-HMSC dibanding dengan senyawa lain diantaranya adalah S-HMSC adalah bio molekul aktif yang tidak memiliki sifat imunogenisitas, tidak menimbulkan efek samping dan ukuran molekulnya yang kecil sangat mudah untuk diabsorpsi menembus barrier kulit menuju dermis.

Adanya potensi S-HMSC sebagai agen alternatif untuk mencegah hiperpigmentasi pada kulit akibat paparan sinar UVB. Maka, dalam

penelitian ini akan diinvestigasi pengaruh S-HMSC dalam sediaan gel pada konsentrasi 100µl dan 200 µl terhadap ekspresi SOD dan MMP-1 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-HMSC terhadap ekspresi SOD dan MMP-1 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB?"

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh S-HMSC terhadap ekspresi SOD dan MMP-1 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan peningkatan ekspresi gen SOD pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB dan pemberian gel S-HMSC kelompok perlakuan pada dosis (P1) 100 µl dan (P2) 200 µl dibandingkan dengan kelompok UVB.
2. Untuk membuktikan penurunan ekspresi gen MMP-1 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB dan pemberian gel S-HMSC kelompok perlakuan pada dosis

(P1) 100 μ l dan (P2) 200 μ l dibandingkan dengan kelompok UVB.

3. Untuk membedakan peningkatan ekspresi gen SOD dan penurunan ekspresi gen MMP-1 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinsuksi sinar UVB dan pemberian gel M-MSCs kelompok UVB dan kelompok perlakuan.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

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

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian (2017-2021)

Peneliti,Tahun	Judul	Metode	Hasil
Se-Ra Park, Jae-Wan Kim, Hee-Sook Jun, Yoo Young Roh, Hwa-Yong Lee, In-Sun Hong, 2017 ²⁴	Stem Cell Sekretom and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing	In Vitro, Eksperiment al	Sekretom meningkatkan kemampuan proliferasi sel kulit seperti fibroblast, keratinosit, dan epitel vascular, meningkatkan perbaikan kulit
Lina Fitria Astari, Haryudi Aji Cahyono, Edi Widjajanto, 2017 ²⁹	Correlation of Interleukin-10, Superoxide Dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) Levels with HbA1c in Pediatric Type 1 Diabetes Mellitus.	Uji Klinis, Eksperiment al	Kadar IL-10 dan SOD secara signifikan menurun, tetapi kadar MDA dan HbA1c meningkat secara signifikan pada kelompok T1DM
Anny Waloski Robert, Felipe Azevedo Gomes, Michele Patricia Rode, Maira Marques da Silva, Maria Beatriz da Rocha Veleirinho, Marcelo Maraschin, Leila Hayashi, Giordano	The skin regeneration potential of a pro-angiogenic sekretom from human skin-derived multipotent stromal cells	In Vivo, Eksperiment al, topical	Hidrogel poli alkohol mengandung sekretom meningkatkan angiogenesis

Wosgrau Calloni, 2019 ²⁵			
Sudha Balasubramanian, Chara Thej, Ankita Wavekar, Priyanka Swamynathan, Pawan K Gupta, Raviraja N Seetharam, Anish S Majumdar, 2017 ²⁶	Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation	In Vitro, eksperimental	<i>Conditional medium</i> MSCS/ sekretom menghambat aktivasi Extra Cellular Matrix (ECM)/MMP sehingga terjadi sintesis kolagen.
Natalia Basalova, Georgy Sagaradze, Mikhail Abartskiy, Evgeniy Evtushenko, Natalia Kalinina, 2019	Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis- Associated microRNAs within Extracellular Vesicles	In vitro Eksperimental,	Secrektom MSCS mencegah diferensiasi myofibroblas dan pembentukan ECM yang dapat menyebabkan turunnya produksi kolagen.
Vivi Yustianingsih, Titiek Sumarawati, Agung Putra, 2019 ²⁷	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 kolagen²⁶.
Penelitian basalova *et al.*, 2017 menggunakan secrektom MSCs untuk mencegah diferensiasi miofibroblas dan pembentukan ECM sehingga

menginduksi pembentuka kolagen pada sel fibroblast secara in vitro. Penelitian yustianingsih *et al.*, 2019 mengungkapkan kondisi hipoksia MSCs meningkatkan produksi sitokin yang di sekresikan 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 UVB dengan mengukur ekspresi gen SOD dan MMP-1.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Superoxide Dismuthase (SOD)

2.1.1. Definisi SOD

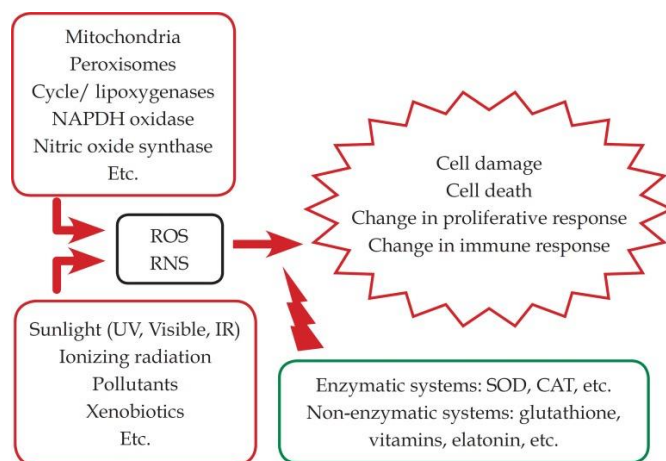
SOD adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisis dismutasi (atau partisi) superoksida ($O_2^{\cdot-}$) radikal menjadi molekul oksigen biasa (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Superoksida diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme oksigen dan, jika tidak diatur, menyebabkan banyak jenis kerusakan sel. Hidrogen peroksida juga merusak dan didegradasi oleh enzim lain seperti katalase. Dengan demikian, SOD merupakan pertahanan antioksidan penting di semua sel hidup yang terpapar oksigen radikal²⁸.

2.1.2. Mekanisme Antioksidan SOD

ROS adalah radikal hidroksil ($HO^{\cdot}$) dan superoksida ($O_2^{\cdot-}$), radikal peroksil dan alkoxyl ($RO_2^{\cdot}$ dan $RO^{\cdot}$), oksigen singlet (1O_2)³⁻⁵, serta hidrogen peroksida (H_2O_2) dan peroksida organik ($ROOH$). Selain kerusakan langsung pada molekul seperti lipid, asam amino dan DNA, ROS dapat mengaktifkan respons seluler enzimatis dan non-enzimatis, dengan potensi untuk memodifikasi proses lain yang akhirnya mengganggu dengan ekspresi gen²⁹.

Antioksidan adalah zat yang bergabung untuk menetralkan spesies oksigen reaktif yang mencegah kerusakan oksidatif pada sel dan jaringan.

Sistem antioksidan kulit terdiri dari zat enzimatik dan non-enzimatik. Di antara antioksidan enzimatik, glutathione peroksidase (GPx), katalase (CAT) dan superoksida dismutase (SOD)³⁰. Di antara beberapa mekanisme antioksidan, SOD memainkan peran sentral dalam berbagai molekul reaktif yang dinetralkan. Meskipun masih belum ada korelasi langsung, model hewan menunjukkan bahwa kurangnya SOD menyebabkan perubahan degeneratif dengan berkurangnya kolagen. Mungkin, vitamin C akan berdampak positif pada status pengurangan SOD yang mencegah atrofi karena degradasi kolagen³¹. Sebuah klinis juga mempelajari sistem antioksidan endogen pada pasien dengan melasma menunjukkan konsumsi yang signifikan dari SOD dan glutathione peroksidase menyebabkan pecahnya keseimbangan redoks³².



Gambar 2.1. Mekanisme keseimbangan redoks di kulit³¹

2.2. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1)

2.2.1. Definisi MMP-1

MMP-1 adalah kolagenase interstisial dan kolagenase fibroblas adalah enzim yang pada manusia dikodekan oleh gen MMP1. Gen tersebut merupakan bagian dari sekelompok gen MMP yang terlokalisasi pada kromosom 11q22.3. MMP-1 adalah kolagenase vertebrata pertama yang dimurnikan untuk homogenitas sebagai protein, dan dikloning sebagai cDNA. MMP-1 memiliki perkiraan berat molekul 54 kDa³³.

2.2.2. Peran MMP-1

Ekspresi MMP-1 meningkat ketika sistem menghadapi gangguan, seperti proses penyembuhan luka, perbaikan, atau remodeling seperti yang terjadi pada beberapa kondisi patologis. Ekspresi kolagenase-1 diatur secara transkripsi oleh faktor pertumbuhan, hormon, dan sitokin, dan aktivitas proteolitik diUVB secara akurat melalui aktivator dan inhibitor seperti - makroglobulin, dan penghambat jaringan metaloproteinase (TIMPs)³⁴. Aktivasi pro-enzim terjadi ketika hubungan sistein yang tidak berpasangan, dalam domain pro urutan PRCGXPD, membentuk jembatan dengan seng katalitik secara kimiawi terganggu seperti misalnya, oleh asam amino fenil merkuri (APMA). Relevansi biologis adalah aktivasi pro-MMP-1 oleh pembelahan proteolitik prodomain yang tampaknya terjadi di secara bertahap membutuhkan setidaknya dua proteinase untuk aktivasi penuh, interaksi urokinase aktivator plasminogen dan stromelysin-1³.

Beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan menginduksi transkripsi MMP-1. Promotornya mengandung TATA kotak di sekitar 30 bp, dan situs AP-1 di sekitar 70 bp. AP-1 mengikat heterodimer Fos–Jun atau homodimer Jun–Jun. Situs AP-1 tambahan adalah ditemukan pada 186 bp yang memiliki peran sederhana dalam basal transkripsi tetapi bertanggung jawab atas peningkatan transkripsi sebagai respons terhadap ester phorbol³⁵. Situs AP-1 bekerja sama dengan berbagai urutan cis-acting, dan khususnya, situs Ap1 pada 1602 bp menarik karena bekerja sama dengan situs Ets yang dibuat oleh polimorfisme nukleotida tunggal pada 1607 bp. Polimorfisme ini diwakili dengan penyisipan basa guanin ekstra yang menciptakan situs pengikatan untuk faktor transkripsi Ets untuk ditingkatkan ekspresi MMP-1. Menariknya, pasien dengan beberapa jenis kanker menunjukkan frekuensi yang lebih tinggi dari dua alel guanin dibandingkan dengan individu yang tidak terpengaruh³⁶.

Penginduksi sitokin MMP-1 termasuk epidermal faktor pertumbuhan, faktor pertumbuhan fibroblast (FGF)-1, -2, -7, dan -9, faktor pertumbuhan hepatosit, faktor perangsang koloni makrofag granulosit, interferon beta dan gamma, faktor pertumbuhan yang diturunkan dari trombosit, faktor pertumbuhan transformasi (TGF) alfa, dan interleukin (IL)-1, -4, -5, -6, -8, dan -10⁴. Pada di sisi lain, TGF dan turunan vitamin A dan asam retinoat all-trans dan retinoid sintesis menekan transkripsi MMP-1. TGF menengahi nya melalui elemen penghambat TGF (TIE). Mutasi pada elemen ini menghasilkan peningkatan yang signifikan antigen polipeptida

basal dan jaringan (TPA) menginduksi transkripsi gen MMP-1 dalam fibroblast menunjukkan bahwa TIE mungkin memiliki peran sebagai MMP-1 penekan konstitutif dalam sel-sel ini⁴.

2.3. Hiperpigmentasi

2.3.1. Definisi

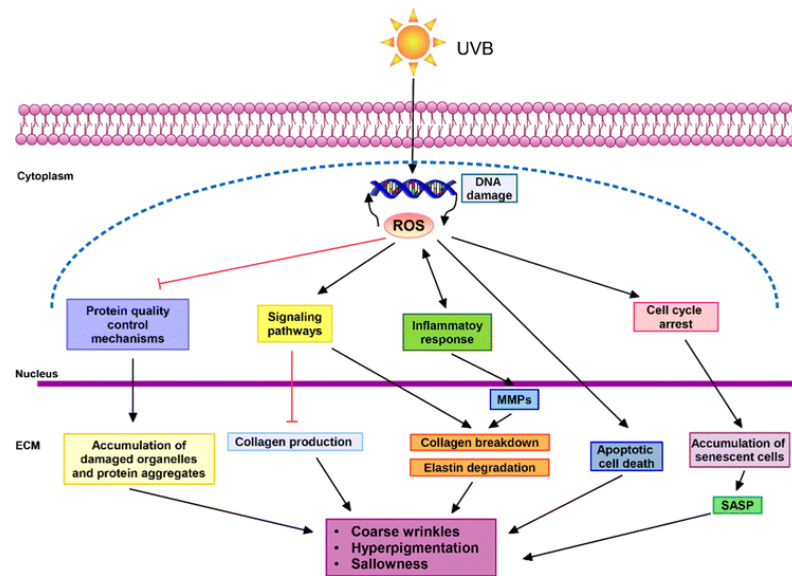
Hiperpigmentasi adalah penuaan dini pada kulit yang disebabkan oleh paparan berulang oleh radiasi UVB, terutama dari matahari tetapi juga dapat disebabkan oleh sumber UVB buatan. Hiperpigmentasi berbeda dari penuaan intrinsik dimana efek merusak dari sinar UVB mengubah struktur kulit normal secara cepat dan signifikan³⁷.

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 hiperpigmentasi dan *photocarcinogenesis*³⁸. Kerusakan kulit pada hiperpigmentasi dapat terjadi pada komponen epidermis, dermis maupun jaringan *appendages* kulit. Salah satu perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit yang mengalami hiperpigmentasi dapat berupa meningkatnya jumlah melanin dan berkurangnya jumlah kolagen secara bermakna³⁹. 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 (*hiperpigmentasi*) 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 akhirnya akan menyebabkan peningkatan pemecahan kolagen serta penurunan produksi kolagen yang merupakan dasar patofisiologi dari penuaan kulit ^{40–}



Gambar 2.2. Skema degradasi kolagen akibat paparan sinar UVB

2.4.Melanin

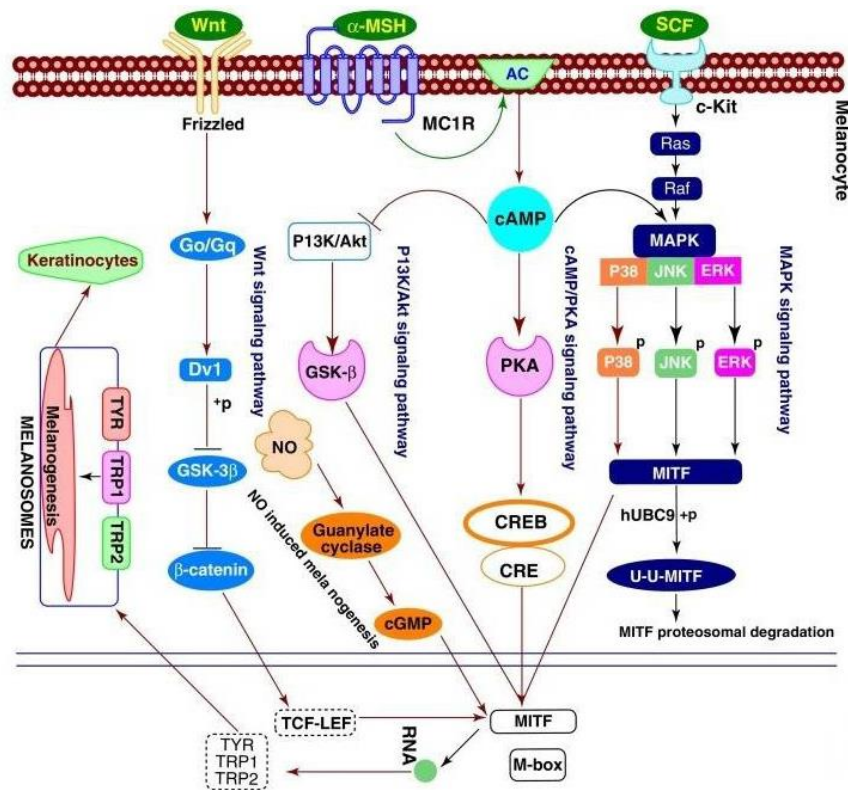
2.4.1. Definisi melanin

Melanin adalah pigmen pengatur warna kulit yang diproduksi melalui proses melanogenesis⁴⁴. 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^{45,46}.

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 melanogenesis ⁴⁷.

Jalur downstream melanogenesis melibatkan penambahan intramolekuler dari gugus amino ke TRP-2 sehingga menghasilkan DOPAchrome. 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 eumelanin ⁴⁸. 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.



Gambar 2.3. Skema kaskade transduksi sinyal melanogenesis^{47,49}

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-1⁵⁰. 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 melanogenesis⁵¹.

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^{51,52}. 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 MITF⁵³. 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-2⁵⁴.

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 MITF⁵⁵. 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 melanogenesis⁵⁶.

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 B⁵⁷.

2.5. Mekanisme Induksi ROS dan MMP-1 akibat Induksi UVB

Paparan sinar UV-B menyebabkan abnormalitas pada *activator-protein 1* (AP-1), yaitu faktor transkripsi yang menghambat produksi kolagen melalui enzim Matriks Metalloproteinase (MMPs). Aktivasi AP-1 akan meningkatkan ekspresi MMP-1, MMP-3 dan MMP-9.

MMP-1 merupakan matriks metalloproteinase yang paling banyak diinduksi oleh paparan sinar UV. MMP-1 menjadi indikator proses photoaging karena merupakan inisiator degradasi kolagen tipe I dan kolagen tipe III, sedangkan MMP-3 hanya dapat men-degradasi kelompok protein ECM, seperti fibronectin dan proteoglycan. Ekspresi MMP-1 menunjukkan peningkatan pada sel fibroblast yang terpapar radiasi sinar UV. MMP-9, disebut juga sebagai gelatinase B, merupakan kelompok sub-grup gelatinase MMPs yang ekspresinya

dipengaruhi oleh aktivasi AP-1. MMP-9 dapat men-digesti kolagen tipe IV, yang merupakan komponen utama penyusun membran dasar kulit. Selain MMP-9, digesti kolagen tipe IV dilakukan juga oleh MMP-2 (gelatinase A)⁵⁸.

Peningkatan sintesis dan ekspresi MMP-1 juga disebabkan oleh kenaikan *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat radiasi sinar UV. MMP-9, disebut juga sebagai gelatinase B, merupakan kelompok sub grup gelatinase MMPs yang ekspresinya dipengaruhi oleh aktivasi AP-1. MMP-9 dapat mendigesti kolagen tipe IV, yang merupakan komponen utama penyusun membran dasar kulit. Selain MMP-9, digesti kolagen tipe IV juga dilakukan oleh MMP-2 (gelatinase A)⁵⁹.

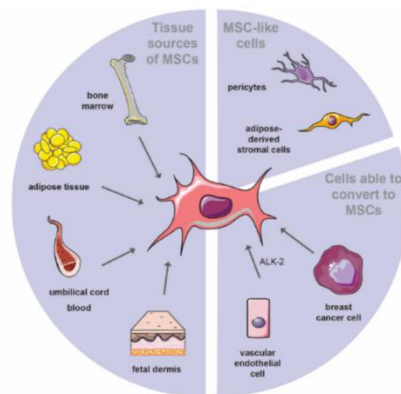
2.6. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

2.6.1. Definisi MSCs

Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adipositas, 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.

2.6.2. Sumber MSCs

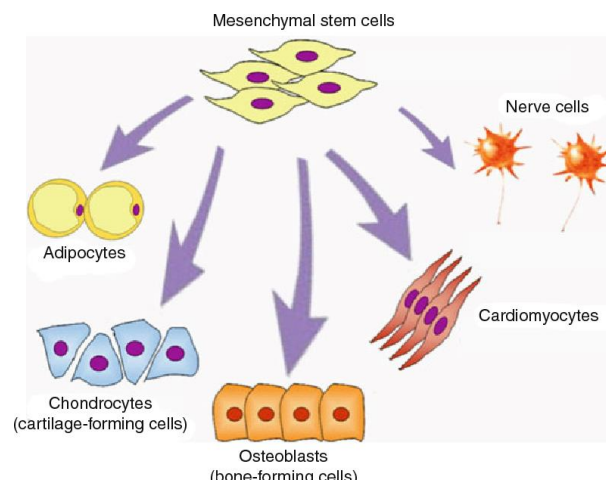
MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta⁶⁰.



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

2.6.3. 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 miosit²⁷. Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengeksresi beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit⁶³.



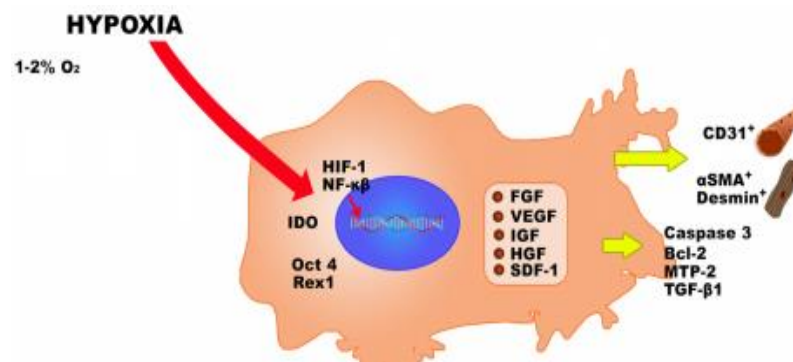
Gambar 2.5. Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁶⁴

2.6.4. 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}.

2.7. 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 MSCs⁶⁷. 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 MSCS⁶⁸

2.8. Sekretom MSCs

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, mikrosesikel, 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 I ⁴. 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* ^{4,73}. Disisi lain TGF β menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan MITF tidak aktif ⁷⁴. Kandungan IL-10 yang tinggi pada secretom dapat menghambat produksi ROS sehingga menurunkan inflamasi dan aktivasi p53 ^{16,75}.

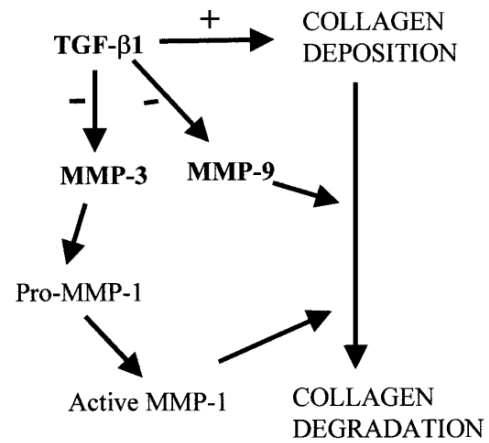
2.9. Pengaruh S-HMSC terhadap ekspresi gen SOD dan MMP-1

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 menecegah pembentukan melanin. Kondisi hipoksia akan semakin memicu MSCs untuk mensekresikan molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator-mediator antiinflamasi dan *growth factor* ^{27,67} selanjutnya di sebut S-HMSCs.

Iradiasi UVB menginduksi peningkatan sintesis dan ekspresi MMP-1 oleh fibroblast dermal yang dirangsang oleh pembentukan ROS. Ekspresi ROS mengaktivasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) *family*. MAPK kinase yang terfosforilasi akan merangsang ekspresi ERK untuk menginduksi c-Fos. Disisi lain MAPK juga mengaktivasi p38 dan JNK untuk meningkatkan ekspresi c-Jun. Kompleks c-Jun dan c-Fos akhirnya membentuk faktor transkripsi AP-1 yang memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 mengakibatkan degradasi kolagen¹⁵. Penelitian lain melaporkan AP-1 juga menghambat pensinyalan TGF- β yang menyebabkan penurunan sintesis prokolagen tipe 1^{76,77}. Ekspresi ROS menginduksi aktivasi transkripsional yang dimediasi NF- κ B dan meregulasi ekspresi gen MMP-1 di fibroblast kulit. Dengan demikian, faktor ROS dan MMP-1 penting dalam proses hiperpigmentasi⁷⁸.

Sitokin TNF, IL-1, dan IL-6 yang berasal dari S-HMSC dapat mencegah melanogenesis melalui penghambatan jalur MAPK sehingga menghambat pembentukan kompleks AP-1⁷⁹. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa IL-10 secara langsung mampu menghambat ekspresi ROS⁸⁰. S-HMSCs menginduksi pembentukan kolagen melalui aktivasi α -SMA yang diperantarai TGF- β ⁸¹. IL-1 MSCs juga terbukti dapat menghambat transkripsi MMP-1⁸². Kandungan lain dari sekretom adalah TGF- β yang terbukti secara signifikan menghambat jalur ERK/MAPK dan PKA sehingga melanogenesis tidak terjadi^{4,73}. Maka dengan adanya S-

HMSCs, merupakan kandidat yang mampu mencegah terjadinya hiperpigmentasi kulit.



Gambar 2.7. Diagram skema TGF-β1 meningkatkan akumulasi kolagen melalui penghambatan MMP dan stimulasi sintesis kolagen.¹⁰²

BAB III

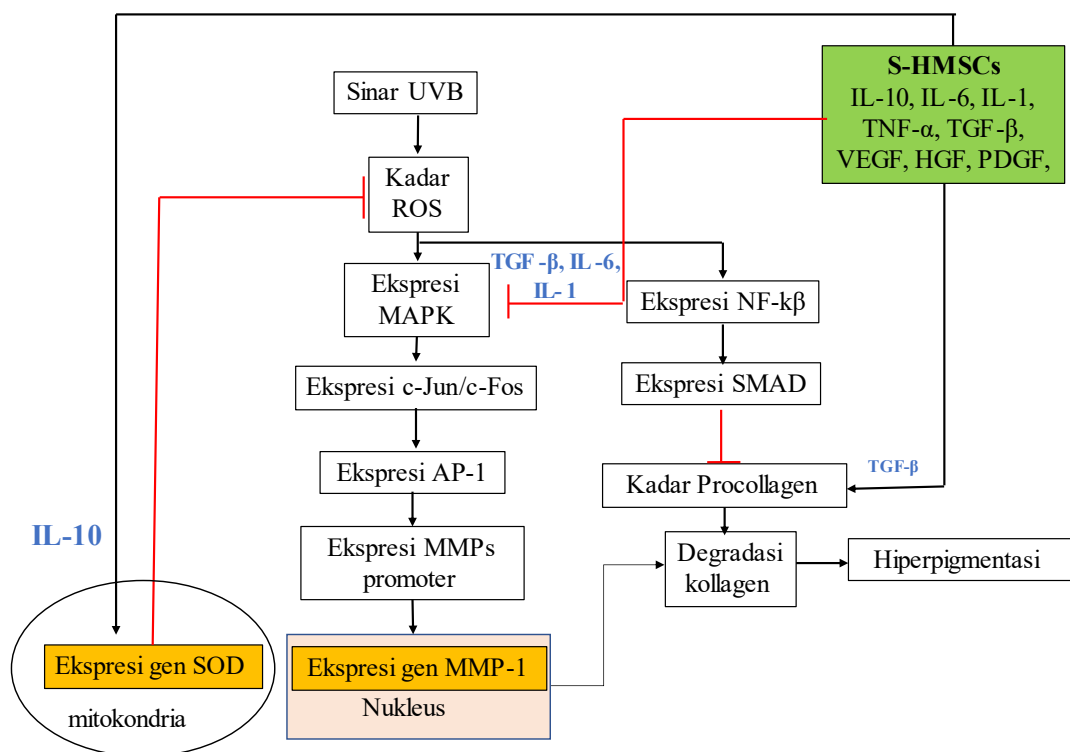
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB dari sinar matahari menginduksi peningkatan produksi ROS yang kemudian akan mengaktifasi MAPK Pathway. Aktivasi MAPK akan mengaktifasi akan merangsang ekspresi ERK untuk menginduksi c-Fos. Disisi lain MAPK juga mengaktifasi p38 dan JNK untuk meningkatkan ekspresi c-Jun. Kompleks c-Jun dan c-Fos akhirnya membentuk faktor transkripsi AP-1¹⁴. AP-1 selanjutnya mengaktifasi faktor transkripsi MMPs antara lain MMP-1, aktivasi ini akan memecah ECM sehingga terjadi degradasi kolagen dan hiperpigmentasi³⁵. Ekspresi ROS menginduksi aktivasi transkripsional yang dimediasi NF- κ B dan meregulasi ekspresi gen MMP-1 difibroblast kulit⁷⁸.

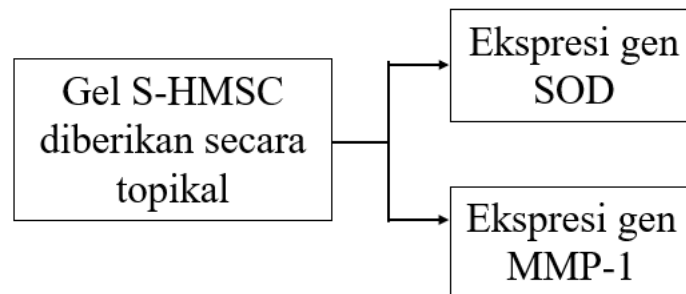
Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal²⁷. Sitokin-sitokin dan mediator–mediator yang muncul sebagai respon 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-HMSC). 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, menginduksi procollagen dengan adanya TGF- β , dan menginduksi SOD akibat peran IL-10 sehingga degradasi kolagen tidak terjadi dan tidak terbentuk hiperpigmentasi⁵⁵.



Gambar 3.3. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.4. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Pemberian gel S-HMSC dapat meningkatkan ekspresi gen SOD dan menurunkan ekspresi gen MMP-1 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dibandingkan dengan kelompok UVB.

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:

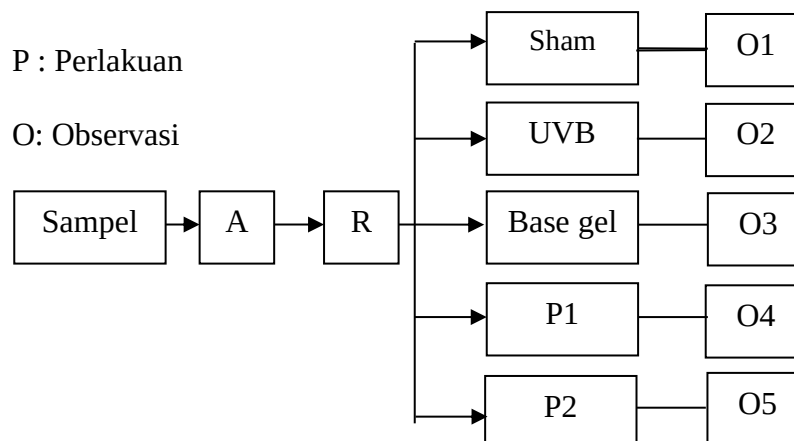
1. Kelompok: Sham (tidak diberi perlakuan),
2. Kelompok: UVB (Irradiasi UVB)
3. Kelompok: Base gel (pemberian basis gel),
4. Kelompok: P1 (pemberian gel S-HMSC dosis $100 \mu\text{L}$),
5. Kelompok: P2 (pemberian gel S-HMSC dosis $200 \mu\text{L}$),

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-HMSC dosis 100 μ l dan 200 μ L.

4.2.2.2. Variabel Terikat

Variabel dependen: ekspresi gen SOD dan MMP-1.

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 melakat 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 Hypoksia MSCs (S-HMSC)

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-HMSC kemudian dicampur dengan menggunakan gel berbasis air sebanyak 0,1 gr sebagai campuran. Sekretom yang digunakan dalam basis gen terbagi dalam beberapa kelompok yaitu kelompok P1 di berikan 100 µl S-HMSC dan kelompok P2 di berikan 200 µl S-HMSC.

Skala: Rasio

4.2.2.3. Ekspresi gen SOD

SOD adalah gen yang memiliki peran dalam mencegah pembentukan melanin sebagai penyeimbang akibat tingginya kadar ROS iradiasi UVB. Sampel jaringan kulit di area penyinaran diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala: Rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen MMP-1

MMP-1 adalah gen yang memiliki peran dalam memecag ECM untuk mencegah pembentukan kolagen. Sampel jaringan kulit di area penyinaran 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 gr 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 hiperpigmentasi.
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

4.3.4. Besar Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih jantan galur *Wistar* dengan masing-masing 5 ekor sampel per kelompok. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 5 perlakuan yaitu perlakuan Sham (tidak diberi perlakuan), K+ (hanya diberi paparan sinar UVB 390 mJ/cm²), Base gelK (hanya diberi gel tanpa tambahan zat lainnya), P1 (Pemberian gel S-HMSC kadar 100 µL), dan P2 (Pemberian gel S-HMSC kadar 200 µL).

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 punggung tikus, steril swab untuk mengoleskan gel S-HMSC. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi gen SOD dan MMP-1 (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 Xylasine.

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 (Phosphate Buffer Saline)
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 komplet 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 setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplet baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 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 ke dalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.

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

7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500µl *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
8. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai UVB untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

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 sebanyak 200 mg dengan sekretom pada P1 dan P2.
2. Pengadukan dilakukan dengan gerakan konstan hingga homogen.

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 sebanyak 3 kali seminggu (hari 1, 3, dan 5) selama 2 minggu ⁸³. Tikus hiperpigmentasi divalidasi dengan

terbentuknya *blackspot* atau pembentukan melanin pada kulit tikus.

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 kemudain 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 μm . Campuran diinkubasi pada suhu 55°C 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 SOD dan MMP-1 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1. Ekspresi mRNA dari SOD dan MMP-1 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.

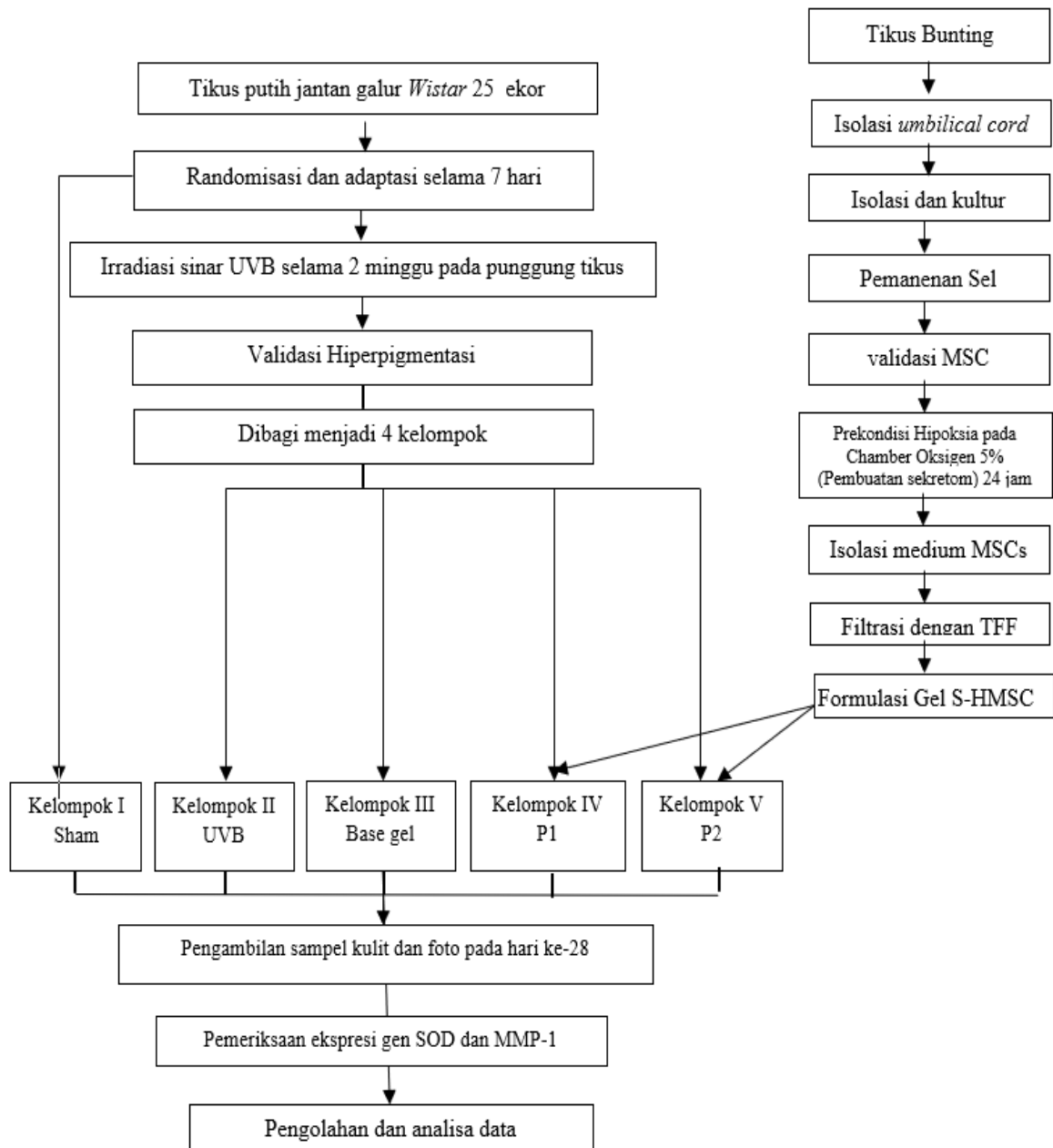
4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember – Januari 2021.

4.7. Analisa Data

Data yang sudah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji varian data dengan uji *Levene*. Sebaran data yang normal dan varian data yang homogen, maka diuji parametrik menggunakan *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* 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

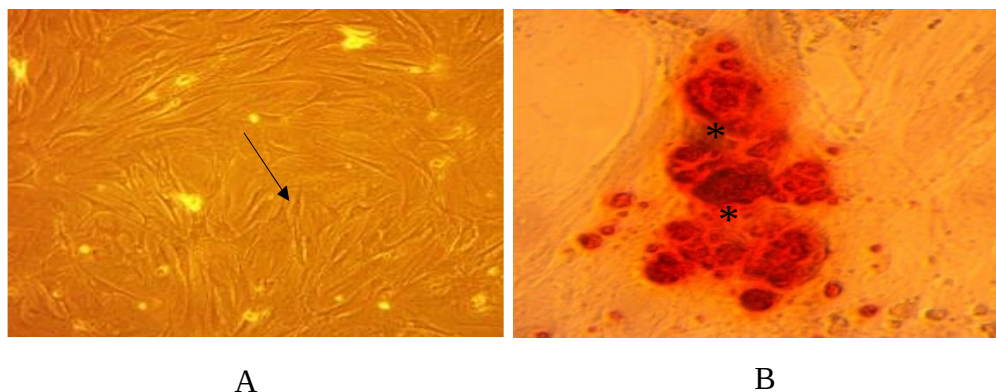
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang selama 3 bulan yaitu dari bulan November 2021 hingga Januari 2022. 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 $390\text{mJ}/\text{cm}^2$ ⁸³. Dalam penelitian ini dikumpulkan sampel sebanyak 25 ekor dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok dengan 2 kelompok perlakuan, 1 kelompok UVB basis gel, dan 1 kelompok UVB positif, dan kelompok sham. Kelompok perlakuan pertama (P1) terdiri atas 5 hewan uji dengan pemberian gel S-HMSC dosisi 100 μL dan kelompok kedua (P2) terdiri atas 5 hewan uji dengan pemberian gel S-HMSC dosis 200 μL . untuk kelompok UVB *vehicle* terdiri dari 5 hewan uji yang mendapatkan basis gel 0,1-gram tanpa S-HMSC. Kelompok UVB positif adalah 5 hewan uji yang mendapatkan paparan UVB tanpa pengobatan, sedangkan kelompok sham adalah kelompok tikus sehat tanpa perlakuan dan intervensi.

5.1. Hasil Penelitian

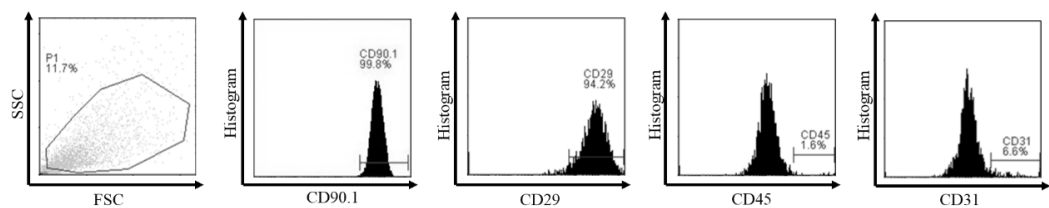
5.1.1. Isolasi Secretome Hipoksia *Mesenchymal Stem Cell* (S-HMSC)

Secretome MSC dikoleksi dari medium MSC *umbilical-cord* tikus bunting yang sudah mencapai pasase ke-4. Hasil validasi morfologi kultur MSC yaitu didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi sel bulat lonjong (*spindle-like cell*) dalam pengamatan mikroskopis, sedangkan hasil validasi diferensiasi osteogenic yaitu MSC dapat berdiferensiasi menjadi osteosit yang diindikasikan dari endapan kalsium warna merah pada populasi MSC menggunakan pewarnaan Alizarin Red (Gambar 5.1. A dan B).



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

Sejalan dengan kemampuan osteogenic MSC, hasil isolasi sel MSC divalidasi menggunakan *flowcytometry* untuk menunjukan MSC mampu mengekspresikan beberapa *surface marker* MSC. Hasil validasi menunjukkan MSC mampu mengekspresikan CD90 (99,80%), CD29 (94,20%) dan tidak mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (6,60%) (Gambar 5.2).



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

Sel MSC diprekondisi hipoksia selama 24 jam dalam chamber hipoksia, selanjutnya medium kultur MSC 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 imunosupresif dan dapat dieksresikan MSC pada kondisi hipoksia, IL-10 memiliki ukuran ~18kDa monomer⁸⁴. TGF- β adalah *growth factor* yang memiliki peran menginduksi kolagen tipe I⁴, TGF- β memiliki ukuran 25kDa dimer⁸⁵.

Tabel 5.1. Data Hasil Penelitian Ekspresi SOD dan MMP-1

Variabel	Kelompok					P value
	Sham	UVB	Basis gel	P1	P2	
	n=5 Mean±SD	n=5 Mean±SD	n=5 Mean±SD	n=5 Mean±SD	n=5 Mean±SD	
Ekspresi SOD	1.00±0.06	0.05±0.01	0.05±0.02	0.47±0.20	1.22±0.47	
<i>Saphiro wilk</i>	0.582	0.928	0.135	0.415	0.714	
<i>Levene test</i>						0.068
<i>One-way Anova</i>						0.000
Ekspresi MMP-1	1.00±0.50	10.10±2.31	9.55±1.29	5.82±1.16	2.86±1.57	
<i>Saphiro wilk</i>	0.967	0.967	0.453	0.099	0.580	
<i>Levene test</i>						0.052
<i>One-way Anova</i>						0.000

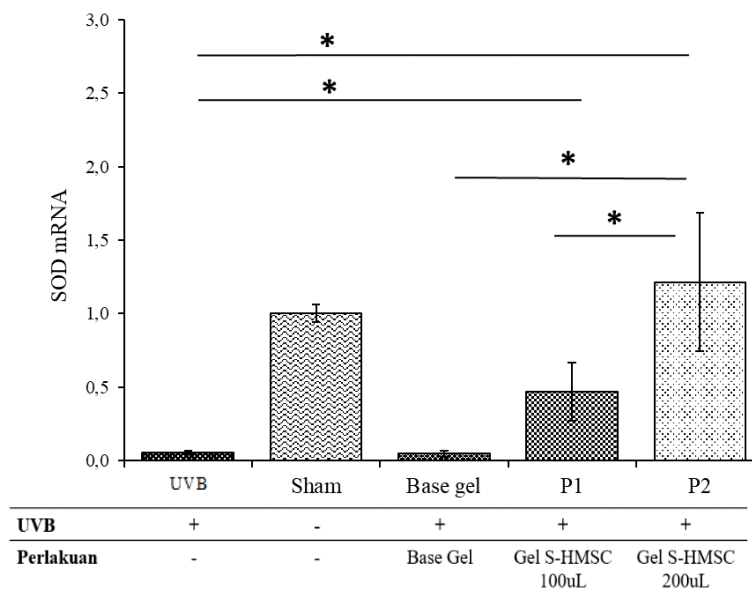
Tabel 5.2. Uji *Post-hoc* LSD ekspresi SOD dan MMP-1 antar kelompok penelitian

	Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
SOD	Sham	UVB	0,000*
		Basis gel	0,000*
		P1	0,000*
		P2	0,000*
	UVB	Basis gel	0,191
		P1	0,000*
		P2	0,000*
	Basis gel	P1	0,000*
		P2	0,000*
	P1	P2	0,000*
MMP-1	Sham	UVB	0,000*
		Base gel	0,000*
		P1	0,000*
		P2	0,017*
	UVB	Base gel	0,694
		P1	0,000*
		P2	0,000*
	Base gel	P1	0,000*
		P2	0,000*
	P1	P2	0,000*

* Uji *Post-hoc* LSD : mean difference significant P < 0.05

5.1.1. Efek Pemberian Gel S-HMSC Pada Ekspresi SOD Tikus Model Hiperpigmentasi

Berdasarkan hasil penelitian, pemberian S-HMSC 200 μ L secara signifikan menginduksi ekspresi SOD hingga 1,22 kali lipat lebih tinggi dari pada seluruh kelompok perlakuan. Pemberian S-HMSC 100 μ L secara signifikan juga dapat meningkatkan ekspresi SOD 0,47 kali jika dibandingkan dengan kelompok lainnya. Meskipun kedua pemberian dosis mampu meningkatkan ekspresi SOD, perlakuan P2 memiliki pengaruh yang signifikan dibandingkan dengan perlakuan P1 (Gambar 5.3.).



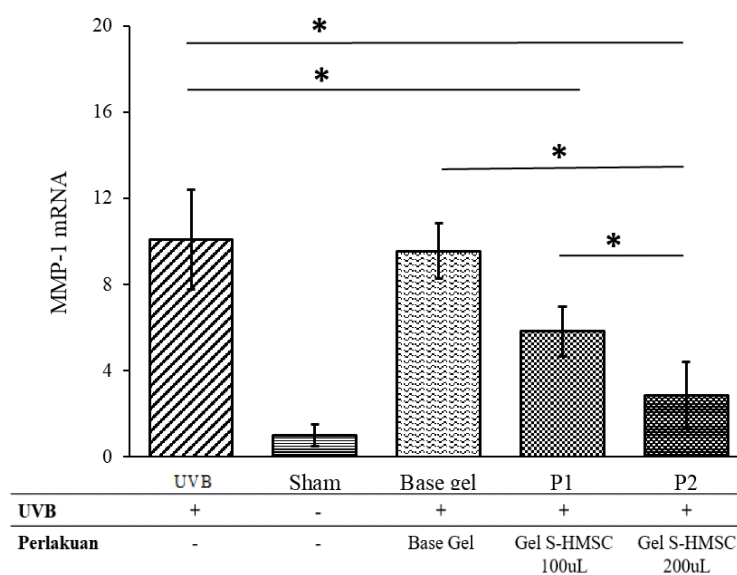
Gambar 5.3. Hasil RT-PCR menunjukkan tingkat ekspresi mRNA SOD pada jaringan kulit masing-masing kelompok. *P < 0,05.

Pada data deskriptif ekspresi SOD 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 $p < 0,05$ (tabel 5.1.). Hasil uji *Post-hoc* LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.3 dan tabel 5.2. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan gel S-HMSC dengan kelompok UVB, Base gel, dan kelompok Sham.

Paparan sinar UVB dengan intensitas sedang hingga tinggi terbukti menginduksi stress oksidatif yang mengarah pada hiperpigmentasi kulit. Sitokin yang diekspresikan oleh sel melanocytes seperti IL-10 menghambat akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) melalui aktivasi enzim SOD. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gel S-HMSC mampu meningkatkan ekspresi SOD seiring dengan penambahan dosis yang diadministrasikan.

5.1.2. Efek Pemberian Gel S-HMSC Pada Ekspresi MMP-1 Tikus Model Hiperpigmentasi

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa pemberian S-HMSC 200 μ L secara signifikan menurunkan ekspresi MMP-1 hingga 7,2 kali dibandingkan kelompok UVB. Pemberian S-HMSC 100 μ L secara signifikan juga dapat menekan ekspresi MMP-1 4,27 kali jika dibandingkan dengan kelompok UVB. Meskipun kedua pemberian dosis mampu menurunkan ekspresi MMP-1, perlakuan P2 memiliki pengaruh yang signifikan dibandingkan dengan perlakuan P1. Namun pemberian base gel tidak signifikan jika dibandingkan dengan kelompok UVB (Gambar 5.4.)



Gambar 5.4. Hasil RT-PCR menunjukkan tingkat ekspresi mRNA MMP-1 pada jaringan kulit masing-masing kelompok. * $P < 0,05$.

Pada data deskriptif ekspresi MMP-1 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene* (Tabel 5.1). 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 $p < 0,05$ (Tabel 5.1). 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-HMSC dengan kelompok UVB, Base gel, dan kelompok Sham.

Hiperpigmentasi merupakan kondisi patologis kulit yang perbaikan dan pencegahannya melibatkan reaksi regenerasi jaringan termasuk pencegahan melanogenesis dan rekonstruksi kolagen. Paparan sinar UVB terbukti menginduksi degradasi kolagen dengan peningkatan enzim MMPs. Sitokin yang diekspresikan oleh S-HMSC seperti IL-1, IL-6 dan TGF- β mampu menghambat sintesis enzim MMPs dan mencegah degradasi kolagen dengan menekan jalur *mitogen activated protein kinase* (MAPK). Pada penelitian ini peneliti

mendapatkan hasil bahwa gel S-HMSC mampu menurunkan ekspresi MMP-1 tergantung dosis.

5.2. Pembahasan

Bukti-bukti literatur terkini menyatakan bahwa *Mesenchymal Stem Cells* dapat mensekresi lebih dari 200 jenis molekul, termasuk faktor pertumbuhan, sitokin dan kemokin, dan protein matriks dan enzim ekstraseluler, yang diantaranya dapat bekerja bersama atau secara independen mampu memicu regenerasi dan peremajaan kulit^{26,86-88}. Sekretom hipoksik *Mesenchymal Stem Cells* (S-HMSC) mengandung faktor-faktor anti-apoptosis seperti IGF-1, GM-CSF, MCSF, dan SCF; faktor angiogenik seperti VEGF, PLGF, Ang-1 dan HGF; faktor anti inflamasi seperti HGF dan TGF β 1, dan juga faktor yang mendorong proliferasi dan migrasi sel progenitor seperti FGF-4, SDF-1, IGF-1, PDGF dan GM-CSF. Sitokin dan faktor pertumbuhan ini serta molekul lain seperti PGE-2 yang disekresikan oleh MSC diketahui dapat menurunkan regulasi inflamasi setelah cedera atau kerusakan akibat gangguan eksternal seperti paparan radiasi secara terus-menerus, atau perawatan laser^{26,86}. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi dosis S-HMSC dalam bentuk sediaan gel terhadap ekspresi gen SOD dan MMP-1 kulit pada tikus model hiperpigmentasi. Hewan uji di induksi paparan sinar UVB 302 nm dengan MED 390mJ/cm² sebanyak tiga kali seminggu selama 2 minggu.

Analisis ekspresi gen SOD (Gambar 5.3) bertujuan untuk mengetahui maker molekuler enzim *superoxidative dismutase* (SOD) pada sampel jaringan kulit tikus hiperpigmentasi setelah diberi perlakuan gel S-HMSC dibandingkan dengan tanpa perlakuan. Ekspresi relative gen SOD mengalami peningkatan pada kelompok perlakuan gel S-HMSC pada dosis 100 uL dan 200 uL ini mengindikasikan bahwa kemungkinan sitokin dalam gel S-HMSC seperti IL-10, IL-12, HGF, G-CSF, INF- γ , TNF- α yang diaplikasikan secara topical mampu meningkatkan aktivasi jalur sintesis dan aktivasi enzim SOD yang melibatkan factor transkripsi NF- κ B^{14,31,89}.

Penelitian-penelitian sebelumnya telah mengkonfirmasi bahwa MSC mampu menurunkan dan menjaga keseimbangan kadar ROS dengan cara meningkatkan pembentukan antioksidan^{90,91}. Regulasi keseimbangan antara level ROS dan antioksidan sangat penting dalam beberapa jalur transduksi sinyal seluler diantaranya pengaturan diferensiasi, proliferasi, migrasi, kelangsungan hidup, dan apoptosis⁹². SOD atau adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisis dismutasi superoksida (O_2^-) radikal menjadi molekul oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Superoksida diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme oksigen dan, jika tidak diatur, menyebabkan banyak jenis kerusakan sel. Dengan demikian, SOD merupakan pertahanan

antioksidan penting di semua sel hidup yang terpapar oksigen radikal^{6,28}.

Telah dilaporkan bahwa *superoxidative dismutase* (SOD) adalah salah satu faktor kunci yang mengurangi produksi melanin yang disebabkan oleh iradiasi UV. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa iradiasi UVB mampu menekan SOD1 secara signifikan, sedangkan diinduksi oleh paparan UVB yang terus menerus dapat mengakibatkan stres fotooksidatif kronis^{2,93}. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa peningkatan SOD dapat menekan proses melanogenesis melalui jalur Tyrosinase⁹³. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ikatan sitokin IL-10, IF- γ , TNF- α dengan reseptor selnya akan mem-fosforilasi NADPH di dalam sitoplasma yang mengakibatkan aktivasi jalur faktor transkripsi NF- κ B melalui mediasi phosphoinositide-3-kinase (PI3K), MAPK, ERK1/2. NF- κ B yang teraktivasi akan masuk ke dalam inti sel untuk menginisiasi translasi dan transkripsi berbagai ekspresi gen antioksidan, termasuk SOD⁹³⁻⁹⁵.

Hasil analisis ekspresi relative gen MMP-1 (Gambar 5.4) digunakan untuk menelusuri marker molekuler enzim *matrix metalloproteinase-1* pada sampel jaringan kulit setelah diberi perlakuan gel S-HMSC dibandingkan dengan tanpa perlakuan. Induksi hiperpigmentasi memicu peningkatan ekspresi MMP-1 yang memicu degradasi kolagen pada jaringan kulit. Hal ini diindikasikan dengan kemungkinan adanya peningkatan sintesis enzim MMP-1. Ekspresi

relative gen MMP-1 mengalami penurunan pada kelompok perlakuan gel S-HMSC pada dosis 100 uL dan 200 uL ini mengindikasikan bahwa kemungkinan sitokin dalam gel S-HMSC seperti TGF- β 1, IL-1 dan IL-6 yang diaplikasikan secara topical mampu mencegah aktivasi jalur sintesis enzim MMP-1. Pada jaringan kulit mamalia, degradasi kolagen di ECM dimediasi oleh aktivitas enzim endopeptidase yang dikenal sebagai matrix metalloproteinases (MMPs) dan inhibitornya, yang disebut Tissue Inhibitor MMP 2 (TIMP2)^{36,96,97}. Peningkatan produksi kolagen oleh fibroblas juga dapat menyebabkan peningkatan deposisi ke dalam ECM, dimana proses ini diregulasi oleh sitokin *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1)⁹⁶. TGF- β 1 diekspresikan oleh berbagai macam sel dan dapat berikatan dengan sebagian besar tipe sel untuk menginisiasi kaskade pensinyalan intraseluler yang terlibat dalam proliferasi, diferensiasi, dan migrasi seluler^{96,98}.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa TGF- β 1 tidak hanya mampu meningkatkan produksi kolagen tetapi juga menghambat MMPs di jalur degradasi kolagen melalui MMP-3 dan MMP-9⁹⁹. TGF- β 1 dapat menekan ekspresi MMP-3 serta MMP-9 meskipun memiliki sedikit efek pada MMP-2. Dimana MMP-3 berperan dalam aktivasi kolagenase interstisial MMP-1, dan MMP-9 adalah gelatinase yang menginduksi penguraian kolagen. Oleh karena itu, penghambatan aktivasi dan sintesis MMP-1 oleh TGF- β 1 dapat meningkatkan akumulasi kolagen.

TGF- β s berikatan dengan dua reseptor serin/treonin kinase yang terdiri dari TGF- β RI dan TGF- β RII. Ketika ligan mengikat, TGF- β RII Fosforilasi TGF- β RI dan mengaktifkan jalur pensinyalan intraseluler seperti Smad3, mitogen-activated protein kinase (MAPK), termasuk protein kinase terkait sinyal ekstraseluler (ERK1/2), p38 MAPK, dan c-Jun N-terminal kinase (JNK). Pada fibroblas kulit manusia, p38 MAPK dan Smad3 bekerja sama dalam meregulasi ekspresi MMP-13 yang diinduksi TGF- β , sedangkan ERK1/2 bekerja sama dengan Smad3 dalam mengatur ekspresi faktor pertumbuhan jaringan ikat^{100–102}.

Keterbatasan pada penelitian ini yaitu tidak mengeksplorasi efek pemberian gel S-HMSC terhadap kadar ROS intraseluler yang diduga secara kuat sebagai salah satu faktor penyebab kerusakan jaringan akibat paparan sinar UVB. Penelitian ini juga tidak menganalisis ekspresi TIMP sebagai MMP inhibitor dalam jalur degradasi kolagen. Disisi lain penelitian ini juga tidak menganalisa densitas kolagen sebagai parameter regenerasi jaringan dan perbaikan hiperpigmentasi. Penelitian ini juga belum dilanjutkan ke fase klinis dengan subjek kulit manusia untuk mengetahui pengaruh gel S-HMSC secara lebih lanjut terhadap kulit manusia.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Pemberian gel S-HMSC dapat meningkatkan ekspresi gen SOD dan menurunkan ekspresi gen MMP-1 pada jaringan kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

6.2. Saran

Saran dari peneliti untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Perlu dilakukan pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian gel S-HMSC pada tikus model hiperpigmentasi.
2. Perlu dilakukan pengukuran ekspresi TIMP setelah dilakukan pemberian gel S-HMSC pada tikus model hiperpigmentasi.
3. Perlu dilakukan pengukuran densitas kolagen setelah dilakukan pemberian S-HMSC pada tikus model hiperpigmentasi.
4. Penelitian dapat dilanjutkan pada fase klinis untuk mengetahui pengaruh gel S-HMSC terhadap kulit manusia.

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 Yokawa K, Kagenishi T, Baluška F. UV-B induced generation of reactive oxygen species promotes formation of BFA-induced compartments in cells of Arabidopsis root apices. *Front Plant Sci* 2016; **6**: 1–10.
- 3 Hayami T, Kapila YL, Kapila S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix Biol* 2008; **27**: 682–692.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 Yin. W, Robyn. B, Alycia. N, Siegfired. H. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 2018; **217**: 1915–1928.
- 7 Oh CT, Lee D, Koo K, Lee J, Yoon HS, Choi YM *et al.* Superoxide dismutase 1 inhibits alpha-melanocyte stimulating hormone and ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin. *Ann Dermatol* 2014; **26**: 681–687.
- 8 Mei M, Weinong H, Jessica M, Keyoumas S, Christoper R S, Diane M F *et al.* UVB induced ERK/AKT-dependent PTEN suppression promotes survival of epidermal keratinocytes. *Physiol Behav* 2016; **176**: 139–148.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; **4**: 551–579.
- 12 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; **70**: 7–30.
- 13 Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, D’Alcontres FS. ROS as Regulators of Cellular Processes in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev*

- 2021; **2021**. doi:10.1155/2021/1208690.
- 14 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.
 - 15 Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17060868.
 - 16 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.
 - 17 Kim YW, Byzova T V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 2014; **123**: 625–631.
 - 18 Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *J Biomed Technol Res* 2014; **1**: 1–21.
 - 19 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.
 - 20 Kim ES, Jeon HB, Lim H, Shin JH, Park SJ, Jo YK *et al*. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibits melanogenesis by promoting proteasomal degradation of MITF. *PLoS One* 2015; **10**: 1–11.
 - 21 Martinez VG, Ontoria-Oviedo I, Ricardo CP, Harding SE, Sacedon R, Varas A *et al*. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha improves immunomodulation by dental mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2017; **8**: 1–12.
 - 22 English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013; **91**: 19–26.
 - 23 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.
 - 24 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.
 - 25 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.
 - 26 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.
 - 27 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. 2019; **38**: 164–171.

- 28 Astari L, Cahyono H, Widjajanto E. Correlation of Interleukin-10, Superoxide Dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) Levels with HbA1c in Pediatric Type 1 Diabetes Mellitus. *J Trop Life Sci* 2017; **7**: 286–292.
- 29 Wölfl U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 1081–1093.
- 30 Arab Sadeghabadi Z, Abbasalipourkabir R, Mohseni R, Ziamajidi N. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level. *J Diabetes Metab Disord* 2019; **18**: 437–443.
- 31 Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol* 2017; **92**: 356–362.
- 32 Arauz J, Ramos-Tovar E, Muriel P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann Hepatol* 2016; **15**: 160–173.
- 33 Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Investig Dermatology Symp Proc* 2009; **14**: 20–24.
- 34 Pardo A, Selman M. MMP-1: The elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 283–288.
- 35 Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; **278**: 16–27.
- 36 Cui N, Hu M, Khalil RA, Mol P, Transl B, Author S. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases HHS Public Access Author manuscript. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017; **147**: 1–73.
- 37 Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 2006; **55**: 1–19.
- 38 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.
- 39 Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; **5**: 1–14.
- 40 Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol* 2013; **2013**: 1–11.
- 41 Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs* 2008; **20**.
- 42 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.
- 43 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.
- 44 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.
- 45 Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 8962–8968.
 - 46 Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007; **445**: 843–850.
 - 47 Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol* 2018; **98**: 924–931.
 - 48 Eichner A, Hänsel M, Domino KB, Hübner M. Case 24: Tibia fracture. *Complicat Mishaps Anesth Cases - Anal - Prev Strateg* 2014; **9783642454**: 233–242.
 - 49 Niu C, Aisa HA. Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. *Molecules* 2017; **22**. doi:10.3390/molecules22081303.
 - 50 Vance KW, Goding CR. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res* 2004; **17**: 318–325.
 - 51 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.
 - 52 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.
 - 53 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.
 - 54 Hong Y, Song B, Chen HD, Gao XH. Melanocytes and skin immunity. *J Investig Dermatology Symp Proc* 2015; **17**: 37–39.
 - 55 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.
 - 56 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.
 - 57 Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; **13**: 460–469.
 - 58 Mirastschijski U, Lupše B, Maedler K, Sarma B, Radtke A, Belge G *et al*. Matrix metalloproteinase-3 is key effector of TNF- α -induced collagen degradation in skin. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 1–14.
 - 59 Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016; **31**: 177–183.
 - 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.
- 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; : 1–8.
- 72 Kevin Range and DMYAM. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* 2012; **23**: 1–7.
- 73 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.
- 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 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.
- 76 Chen B, Li R, Yan N, Chen G, Qian W, Jiang HL *et al*. Astragaloside IV controls collagen reduction in photoaging skin by improving transforming growth factor- β /Smad signaling suppression and inhibiting matrix

- metalloproteinase-1. *Mol Med Rep* 2015; **11**: 3344–3348.
- 77 Lee YR, Noh EM, Han JH, Kim JM, Hwang JK, Hwang BM *et al.* Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 2012; **674**: 80–86.
- 78 Yao C, Lee DH, Oh JH, Kim MK, Kim KH, Park CH *et al.* Poly(I : C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2015; **80**: 54–60.
- 79 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.
- 80 Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC *et al.* The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; **6**: 1779–1783.
- 81 Ueha S, Shand FHW, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol* 2012; **3**: 1–6.
- 82 Chen MS, Lin CY, Chiu YH, Chen CP, Tsai PJ, Wang HS. IL-1 β -induced matrix metalloprotease-1 promotes mesenchymal stem cell migration via PAR1 and G-protein-coupled signaling pathway. *Stem Cells Int* 2018; **2018**. doi:10.1155/2018/3524759.
- 83 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.
- 84 Karan S, Dash P, Kaushik H, Sahoo PK, Garg LC, Dixit A. Structural and Functional Characterization of Recombinant Interleukin-10 from Indian Major Carp Labeo rohita. *J Immunol Res* 2016; **2016**. doi:10.1155/2016/3962596.
- 85 Baillie R, Coombes RC, Smith J. Multiple forms of TGF- β 1 in breast tissue: A biologically active form of the small latent complex of TGF- β 1. *Eur J Cancer Part A* 1996; **32**: 1566–1573.
- 86 Saheli M, Bayat M, Ganji R, Hendudari F, Kheirjou R, Pakzad M *et al.* Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors. *Arch Dermatol Res* 2020; **312**: 325–336.
- 87 Fui LW, Lok MPW, Govindasamy V, Yong TK, Lek TK, Das AK. Understanding the multifaceted mechanisms of diabetic wound healing and therapeutic application of stem cells conditioned medium in the healing process. *J Tissue Eng Regen Med* 2019; **13**: 2218–2233.
- 88 Kumar PL, Kandoi S, Misra R, Shanker Verma R. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. 2019. doi:10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.
- 89 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.

- 90 Jung KJ, Lee GW, Park CH, Lee TJ, Kim JY, Sung EG *et al.* Mesenchymal Stem Cells Decrease Oxidative Stress in the Bowels of Interleukin-10 Knockout Mice. *Gut Liver* 2020; **14**: 100.
- 91 Rahimi B, Panahi M, Saraygord-Afshari N, Taheri N, Bilici M, Jafari D *et al.* The secretome of mesenchymal stem cells and oxidative stress: challenges and opportunities in cell-free regenerative medicine. *Mol. Biol. Rep.* 2021; **48**: 5607–5619.
- 92 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.
- 93 Oh CT, Lee D, Koo K, Lee J, Yoon HS, Choi YM *et al.* Superoxide Dismutase 1 Inhibits Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone and Ultraviolet B-Induced Melanogenesis in Murine Skin. *Ann Dermatol* 2014; **26**: 681–687.
- 94 Münch G, Gunawardena D, Raju R. NEURAL REGENERATION RESEARCH Hydrogen peroxide mediates pro-inflammatory cell-to-cell signaling: a new therapeutic target for inflammation? doi:10.4103/1673-5374.253529.
- 95 Zhou X, Du HH, Ni L, Ran J, Hu J, Yu J *et al.* Nicotinamide Mononucleotide Combined With Lactobacillus fermentum TKSNO41 Reduces the Photoaging Damage in Murine Skin by Activating AMPK Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 2021; **12**: 413.
- 96 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 inhib1. Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY, et al. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procolla. *J Formos Med Assoc* 2017; **116**: 351–358.
- 97 Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich spatholobus suberectus stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; **11**. doi:10.3390/nu11061341.
- 98 Mazini L, Rochette L, Hamdan Y, Malka G. Skin Immunomodulation during Regeneration: Emerging New Targets. *J Pers Med* 2021, Vol 11, Page 85 2021; **11**: 85.
- 99 Johnston EF, Gillis TE. Transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) stimulates collagen synthesis in cultured rainbow trout cardiac fibroblasts. *J Exp Biol* 2017; **220**: 2645–2653.
- 100 Shek FWT, Benyon RC, Walker FM, McCrudden PR, Pender SLF, Williams EJ *et al.* Expression of Transforming Growth Factor-β1 by Pancreatic Stellate Cells and Its Implications for Matrix Secretion and Turnover in Chronic Pancreatitis. *Am J Pathol* 2002; **160**: 1787–1798.
- 101 Lee DC, Choi H, Oh J-M, Lee J, Lee J, Lee HY *et al.* Urban particulate matter regulates tight junction proteins by inducing oxidative stress via the Akt signal pathway in human nasal epithelial cells. 2020. doi:10.1016/j.toxlet.2020.07.017.

- 102 Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 2002; **45**: 1011–1016.