

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME*
MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA
TERHADAP EXPRESI GEN p21 dan cyclin D
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Jantan
Collagen Loss yang Diinduksi Sinar UV-B)**

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister Ilmu Biomedik



Irvan Agung

MBK 2321010356

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

2024

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA* TERHADAP EXPRESI GEN p21 dan cyclin D (Studi Eksperimental *in Vivo* pada Tikus Wistar Jantan *Collagen Loss* yang Diinduksi Sinar UV-B)

Disusun oleh:

Irvan Agung

MBK. 23.21.010356

Akan dipertahankan di depan Tim Penguji

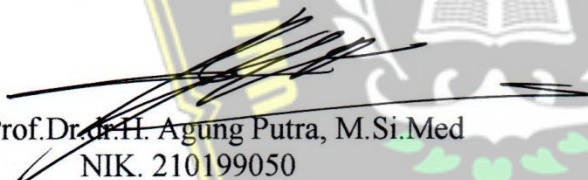
Pada tanggal 29 Agustus 2024

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk di terima

Menyetujui.

Pembimbing I

Pembimbing II


Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210199050



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

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung




Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210199050

PERNYATAAN

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

Sumbawa, 29 Agustus 2024



Irvan Agung
MBK 2321010356



KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah sehingga penulis mampu menyelesaikan proposal tesis ini dengan judul “ **PENGARUH PEMBERIAN EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA TERHADAP EXPRESI gen p21 dan cyclin D (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Jantan *collagen loss* yang diinduksi sinar UV-B)**”. Penyusunan proposal tesis ini sebagai salah satu syarat kelulusan dalam jenjang pendidikan Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Proposal tesis ini dapat tersusun dan terselesaikan karena adanya bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH.,M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para Wakil Rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Masgister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang
3. Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi.Med selaku pembimbing I sekaligus Ka.Prodi Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang
4. Dr. dr. Eko Setiawan,Sp.B selaku pembimbing II

5. Penguji I Dr.dr.Chodidjah,M.Kes
6. Penguji II Prof.Dr.dr.Dedy Hermansyah,Sp.B,Subsp.Onk(K)
7. Penguji III Prof.Dr.Ir.Hj.Titiek Sumarawati,M.Kes
8. Kepada orang tua yang senantiasa mendukung serta mendoakan
9. Kepada istri tercinta Rahayu Setia Ningsih,SH, anak kami Varah Nabila Ramadhani, Dewi Rizkyta Asmara, Shafira Delisha Effendi yang senantiasa mendukung serta mendoakan
10. Segenap staf Stem Cell & Cancer Research (SCCR)
11. Segenap staf administrasi program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
12. Teman-teman program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan Proposal ini, terimakasih atas dukungannya. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan proposal penelitian ini.

Sumbawa, 29 Agustus 2024

Irvan Agung
MBK 2321010356

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
ABSTRAK.....	xviii
ABSTRACT	xix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Protein 21 (p21).....	9
2.2. Cyclin D	11
2.3. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs)	12
2.3.1. Definisi MSCs.....	12
2.3.2. Sumber MSCs	13
2.3.3. Karakteristik MSCs.....	13

2.3.4.	Peran MSCs.....	14
2.4.	<i>Exosome</i> MSCs.....	15
2.5.	<i>Collagen</i>	16
2.5.1.	Definisi.....	16
2.5.2.	Perubahan pada <i>collagen</i>	19
2.5.3.	Mekanisme kerusakan <i>collagen</i>	20
2.5.4.	Sintesis <i>Collagen</i>	21
2.5.5.	Sintesis <i>Procollagen</i>	22
2.6.	Efek <i>Exosome</i> MSCs terhadap Ekspresi Gen p21 dan Cyclin D pada Tikus yang dipapar Sinar UV-B.....	25
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		28
3.1.	Kerangka Teori.....	28
3.2.	Kerangka Konsep	32
3.3.	Hipotesis	32
BAB IV METODE PENELITIAN		33
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	33
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	35
4.2.1.	Variabel Penelitian	35
4.2.2.	Defenisi Operasional.....	35
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	37
4.3.1.	Subjek Penelitian.....	37
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	38
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	39
4.3.4.	Besar Sampel.....	39
4.4.	Alat dan Bahan	40
4.4.1.	Alat.....	40
4.4.2.	Bahan	40
4.5.	Cara Penelitian.....	41
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	41
4.5.2.	Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> .	42

4.5.3.	Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i>	43
4.5.4.	Isolasi <i>Exosome</i> MSCs hypoxia	44
4.5.5.	Penyinaran UV-B dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	45
4.5.6.	Pengambilan Sampel Jaringan	46
4.5.7.	Pembuatan Blok Parafin.....	47
4.5.8.	Validasi Berkurangnya <i>Collagen</i> Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan <i>Collagen</i>	47
4.5.9.	Analisis Kuantitatif Ekspresi gen p21 dan cyclin D menggunakan RT-PCR	49
4.6.	Langkah Penelitian	49
4.7.	Tempat dan Waktu Penelitian	51
4.8.	Analisis Data	51
4.9.	Alur Penelitian.....	53
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		54
5.1.	Hasil Penelitian.....	55
5.1.1.	Hasil Validasi MSCs	55
5.1.2.	Efek Pemberian E-MSCs terhadap Ekspresi Gen p21	59
5.1.3.	Efek Pemberian E-MSCs terhadap Ekspresi Gen Cyclin D	62
5.2.	Pembahasan	64
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		69
6.1.	Kesimpulan.....	69
6.2.	Saran.....	69
DAFTAR PUSTAKA		70
LAMPIRAN.....		78

DAFTAR SINGKATAN

AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
JNK	: <i>C-Jun NH2-terminal Kinase</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metallo Proteinase</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Protein 53</i>
p21	: <i>Protein 21</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UV-B	: <i>Ultraviolet-B</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
UV-A	: <i>Ultraviolet-A</i>
UV-C	: <i>Ultraviolet-C</i>
Cyclin D	: <i>Cyclin Dependent</i>
CDKs	: <i>Cyclin - Dependent Kinases</i>
p16	: <i>Protein 16</i>
pRb	: <i>Protein Retinoblastoma</i>
SASP	: <i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
CD9	: <i>Cytoplasmic Domain 9</i>
CD63	: <i>Cytoplasmic Domain 63</i>
CD81	: <i>Cytoplasmic Domain 81</i>
HSP60	: <i>Heat Shock Protein 60</i>
HSP70	: <i>Heat Shock Protein 70</i>

HSP90	: <i>Heat Shock Protein 90</i>
Alix	: ALG-2-Interacting protein X
TSG101	: Tumor Suppressor Protein Gen 101
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
E-MSCs	: <i>Exosome-MSCs</i>
C-Fos	: <i>Oncogen Celuler Fos</i>
C-Jun	: Protein Complex Jun
EHMT	: Enzyme Histone Methyl Transferase
Cdh1	: Gen E-cadherin 1
RAS	: <i>Rat Sarcoma</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
CXCL-1	: CXC motif chemokine Ligand 1
CCL-2	: CC motif Ligand 2
MYC	: <i>Myelocytomatosis</i>
α-SMA	: <i>Alpha-SM-Actin</i>
PCNA	: <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
fase G1/S	: <i>Fase G stands for gap/Sintesis</i>
RAF	: <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
PKA	: <i>p21 Kinase Activated</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
MDM2	: <i>Murine Double Minute 2</i>
GADD45	: <i>Growth Arrest and DNA-Damage inducible gene 45</i>
ATM	: <i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>
ATR	: <i>Rad3-related</i>
Chk1/2	: <i>Checkpoint Kinase 1 and 2</i>
Cdc25A	: <i>Cell Division Cycle 25A</i>
CDK4/6	: <i>Cyclin-Dependent Kinase 4 and 6</i>

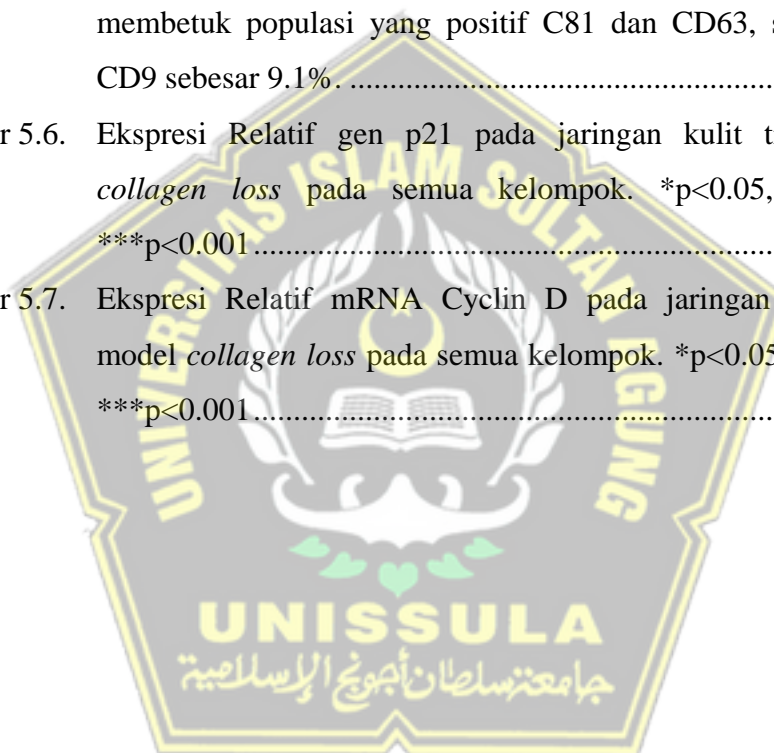
SMAD2/3 : *Small Mothers Against Decapentaplegic 2 and 3*
SMAD4 : *Small Mothers Against Decapentaplegic 4*
HA : *Hyaluronic Acid*
GAPDH : *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
PBS : *Phospat Buffer Saline*
TFF : *Tangential Flow Filtration*
PCR-RFLP : *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length
Polymorphism*



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Peran sentral p21 dalam merasakan dan merespon sejumlah besar rangsangan	10
Gambar 2.2.	Cyclin D-CDK4,6 Mengkomplekskan Target Rb untuk Fosforilasi dengan Memasang Helix C-Terminal	12
Gambar 2.3.	Sumber <i>mesenchymal stem cell</i> (MSCs)	13
Gambar 2.4.	Kemampuan diferensiasi dari MSCs	14
Gambar 2.5.	Perbedaan <i>Collagen</i> Pada Kulit Muda dan Kulit Tua. Jumlah <i>Collagen</i> pada kulit yang lebih muda lebih banyak dibandingkan kulit yang lebih tua	17
Gambar 2.6.	Sintesis <i>Collagen</i>	24
Gambar 2.7.	<i>Procollagen</i>	25
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	31
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	32
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian	34
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	53
Gambar 5.1.	Tikus kelompok sehat tidak terdapat kemerahan dan kerutan (A), Tikus yang terpapar UV-B tanpa perlakuan tampak memerah dan kerutan (B), <i>Masson Trichome</i> dengan warna biru yang menandakan adanya produksi <i>Collagen</i> (C), Kulit Tikus yang terpapar UV-B dengan menunjukkan warna merah yang menandakan degradasi <i>Collagen</i> (<i>Collagen loss</i>) (D). *Panah hitam menunjukkan deposisi kolagen.	55
Gambar 5.2.	Karakter morfologi sel hasil Isolasi. Morfologi sel hasil Isolasi memiliki karakter seperti MSC yaitu berbentuk bulat lonjong inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol (<i>fibroblast-like</i>) dengan perbesaran mikroskop 100x (a) dan perbesaran 200x (b). Scale bar: 50µm.	57
Gambar 5.3.	Kemampuan differensiasi sel hasil isolasi. (a) Sel hasil Isolasi mampu mampu berdiferensiasi menjadi <i>osteocyte</i> pada	

- pengamatan pewarnaan *Alizarin red* dan (b) berdiferensiasi menjadi *adipocyte* pada pengamatan pewarnaan *Oil Red dye* pada pembesaran 400x. *Panah kuning: menunjukkan deposisi kalsium, panah hitam: menunjukkan lipid droplet. 57
- Gambar 5.4. Hasil analisis flowcytometry sel hasil isolasi. Sel hasil Isolasi memiliki ekspresi CD90.1 dan CD29 yang tinggi serta ekspresi CD45 dan CD31 yang rendah..... 58
- Gambar 5.5. Hasil analisis flowcytometry Exosome-MSC. Exosome MSCs membentuk populasi yang positif C81 dan CD63, serta positif CD9 sebesar 9.1%. 58
- Gambar 5.6. Ekspresi Relatif gen p21 pada jaringan kulit tikus model *collagen loss* pada semua kelompok. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 62
- Gambar 5.7. Ekspresi Relatif mRNA Cyclin D pada jaringan kulit tikus model *collagen loss* pada semua kelompok. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 64



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 4.1.	Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i>	44
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada ekspresi p21 dan ekspresi Cyclin D.....	59
Tabel 5.2.	Perbedaan Ekspresi p21 Antar 2 Kelompok.....	60
Tabel 5.3.	Perbedaan Ekspresi Cyclin D Antar 2 Kelompok	63



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	78
Lampiran 2. Surat Keterangan Penelitian	79
Lampiran 3. Hasil Analisis.....	80
Lampiran 4. Hasil Data SPSS	82
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian.....	93



ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan sinar UV-B dapat menyebabkan penuaan kulit dini, yang ditandai dengan hilangnya kolagen dan perubahan siklus sel. Exosome dari Mesenchymal Stem Cells (MSCs) yang dikultur dalam kondisi hipoksia telah menunjukkan potensi terapeutik yang menjanjikan dalam regenerasi jaringan.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian exosome MSCs hipoksia terhadap ekspresi gen p21 dan cyclin D pada model tikus Wistar jantan dengan collagen loss yang diinduksi sinar UV-B.

Metode: Penelitian merupakan penelitian eksperimental *in-vivo* yang menggunakan rancangan penelitian berupa *posttest only control group* dengan metode rancang acak lengkap. Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram. Tikus putih jantan Galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K1 (tikus sehat tanpa paparan UV-B), K2 (tikus dipapar UV-B tanpa perlakuan), K3 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HA dosis 200uL secara subkutan), K4 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs dosis 200uL secara subkutan) dan K5 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs dosis 300uL secara subkutan). Ekspresi gen p21 dan cyclin D dianalisis menggunakan RT-qPCR.

Hasil : Ekspresi gen p21 mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan dosis E-MSCs pada tikus collagen loss yang diinduksi sinar UV-B secara signifikan dibandingkan kontrol (K5=0,91; K4=0,73 vs K2=0,28; $p<0.05$). Ekspresi gen cyclin D juga meningkat secara signifikan pada kelompok E-MSCs dibandingkan dengan kontrol (K5=0,84; K4=0,78 vs K2=0,52; $p<0,05$).

Kesimpulan : Pemberian E-MSCs secara subkutan dengan dosis 200 μ l dan 300 μ l dapat menginduksi ekspresi gen p21 dan cyclin D pada tikus model collagen loss yang dipapar sinar UV-B MSCs dibandingkan kontrol secara *in vivo*.

Kata Kunci : E-MSCs, p21, cyclin D, dan Collagen Loss

ABSTRACT

Background: Exposure to UV-B rays can cause premature skin aging, characterized by collagen loss and alterations in the cell cycle. Exosomes from Mesenchymal Stem Cells (MSCs) cultured under hypoxic conditions have shown promising therapeutic potential in tissue regeneration.

Objective: This study aims to evaluate the effect of administering hypoxic MSC exosomes on the expression of p21 and cyclin D genes in male Wistar rats with collagen loss induced by UV-B radiation.

Methods: This is an in-vivo experimental study using a posttest-only control group design with a completely randomized method. The subjects in this study were male Wistar rats aged 2-3 months with body weights ranging from 200-250 grams. The rats were divided into 5 groups: K1 (healthy rats without UV-B exposure), K2 (rats exposed to UV-B without treatment), K3 (rats exposed to UV-B and treated with 200 μ L of HA subcutaneously), K4 (rats exposed to UV-B and treated with 200 μ L of E-MSCs subcutaneously), and K5 (rats exposed to UV-B and treated with 300 μ L of E-MSCs subcutaneously). The expression of p21 and cyclin D genes was analyzed using RT-qPCR.

Results: The expression of the p21 gene significantly increased with the increasing dose of E-MSCs in rats with collagen loss induced by UV-B radiation compared to the control group (K5 = 0.91; K4 = 0.73 vs. K2 = 0.28; $p < 0.05$). The expression of the cyclin D gene also significantly increased in the E-MSCs groups compared to the control group (K5 = 0.84; K4 = 0.78 vs. K2 = 0.52; $p < 0.05$).

Conclusion: Subcutaneous administration of E-MSCs at doses of 200 μ L and 300 μ L can induce the expression of p21 and cyclin D genes in a collagen loss rat model exposed to UV-B radiation compared to the control group in vivo.

Keywords: E-MSCs, p21, cyclin D, and Collagen Loss

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Irradiasi *Ultraviolet* (UV) dianggap sebagai salah satu faktor eksternal berbahaya, yang mengakibatkan perubahan fisik dan kimia pada organisme hidup.^{1,2} Degradasi *collagen* telah menyebabkan kerutan kulit dan berpotensi berperan dalam kanker kulit.^{3,4} Beberapa laporan menunjukkan degradasi *collagen* oleh radiasi UV-B^{5,6} melibatkan asam amino aromatik dan pemotongan rantai polipeptida.^{7,8} *Collagen loss* merupakan salah satu efek merugikan yang disebabkan karena irradiasi Sinar *Ultraviolet-B* (UV-B). Paparan sinar UV-B menginduksi terjadinya stress oksidatif yang ditandai dengan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Penumpukan kadar ROS dikulit akibat UV-B menginduksi terjadinya kerusakan DNA pada sel fibroblast dan keratinosit. Kerusakan DNA mengaktifkan jalur ekspresi gen p53 yang menyebabkan peningkatan ekspresi gen p21, dimana merupakan pos pemeriksaan dalam fase G1 dari siklus sel dan terlibat dalam regulasi siklus sel. Salah satu *check point* pada siklus sel G1 di tandai dengan peningkatan ekspresi gen Cyclin D.

Collagen loss didorong oleh interaksi jalur sinyal yang kompleks. Untuk mendorong penghentian siklus sel, p16^{INK4A} (CDKN2A), disertai dengan target p53 (TP53) p21 (CDKN1A), menghambat *Cyclin - Dependent Kinases* (CDKs) , sehingga mencegah fosforilasi protein *Retinoblastoma* (pRb) dan pada gilirannya menekan ekspresi gen terkait proliferasi^{9,10}.

Selain itu kompleks protein kappa B faktor nuklir (NF-κB) bertindak sebagai pengatur utama SASP dan bisa mempengaruhi lingkungan mikro sel-sel tua termasuk pengawasan kekebalannya^{11,12,13,14}. Dari efek *collagen loss* tersebut, terapi *Exosome* dapat dijadikan solusi dalam mengatasi permasalahan tersebut. Secara umum *exosome* dicirikan oleh penanda *exosome* termasuk ; CD9 , CD63 , CD81 , HSP60, HSP70, HSP90, Alix, dan TSG 101¹⁵. Baru-baru ini *exosome* yang berasal dari MSC telah mendapat perhatian karena kapasitasnya yang besar untuk terapeutik.

Sebanyak 4.2% dari 142 subjek positif mengalami penurunan *collagen* setelah terpapar tiga kali dengan dosis minimal erythema UV-B (MED) pada tahun 2015¹⁷. Kasus keriput dan pigmentasi meningkat secara signifikan pada tahun 2020, dengan sekitar 100 - 350 kasus baru¹⁸. Pengobatan standar untuk penurunan *collagen* kulit berfokus pada perlindungan terhadap paparan UV-B dan perbaikan kerusakan jaringan menggunakan bahan kimia seperti 5-fluorouracil dan retinoid¹⁹, yang dapat menimbulkan efek samping serius termasuk resiko kanker. Kultur sel primer yang terpapar UVB menunjukkan bahwa 40 - 60% sel mengalami peningkatan sitokin proinflamasi dan penurunan ekspresi berbagai *Growth Factor*²⁰, serta penurunan enzim antioksidan SOD. Penurunan ini menghambat sintesis *collagen* dan memicu proses inflamasi yang berkontribusi terhadap pigmentasi kulit^{21,22}.

Telah dilaporkan *Exosome* yang diturunkan dari MSC (*Exosome- MSCs*) dapat meningkatkan penyembuhan luka serta regenerasi jaringan

melalui peningkatan migrasi, proliferasi fibroblas dan mendorong angiogenesis serta menginduksi perekrutan sel induk endogen. Proses biologis SASP berkaitan erat dengan penuaan seluler. Kerusakan DNA mengaktifkan p53 yang dapat menyebabkan peningkatan p21 dimana merupakan pos pemeriksaan dalam fase G1 dari siklus sel dan terlibat dalam regulasi siklus sel²³. Ekspresi p21 sangat menurun pada transkriptome, yang mungkin terkait dengan peningkatan ekspresi MYC dan JUN. Berbagai mekanisme mengatur kadar p21 dalam sel, termasuk regulasi transkripsional, pembungkaman epigenetik, stabilitas mRNA, serta degradasi protein yang bergantung pada ubiquitin dan tidak bergantung pada ubiquitin. MYC merekrut Dnmt3, sebuah corepressor DNA methyltransferase, ke promotor p21 dan menekan transkripsi p21. C-JUN dapat menghambat transkripsi p21 dengan bekerja pada situs Sp1-3. Cyclin D1 merupakan tipe cyclin yang paling berhubungan dengan gen yang terlibat dalam siklus sel. Cyclin D1 merupakan protein inti yang berikatan dengan CDK4/CDK6 membentuk kompleks cyclin D1-CDK4/6, yang terlibat dalam proses fosforilasi protein retinoblastoma (pRb) pada fase G1 dan S siklus sel serta berperan penting dalam membantu perbaikan DNA sel.

Exosome-MSCs memiliki peran penting dalam regulasi p21 dan cyclin D, namun peran pada kulit yang terpapar UV-B masih belum dikaji. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan dalam mengkaji peran *Exosome*

MSCs pada *collagen loss* akibat paparan UV-B pada ekspresi gen p21 dan cyclin D.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat dirumuskan adalah "Apakah terdapat pengaruh pemberian *Exosome-Mesenchymal Stem Cells* (E-MSCs) hypoxia terhadap ekspresi gen p21 dan cyclin D pada tikus model *collagen loss* dipapar sinar UV-B?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian *Exosome-Mesenchymal Stem Cells* (E-MSCs) hypoxia terhadap ekspresi gen p21 dan cyclin D pada tikus model *collagen loss* dipapar sinar UV-B.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain untuk :

- a. Mengetahui ekspresi gen p21 pada tikus model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B setelah diberi E-MSCs secara subcutan dengan dosis 200µl dan 300µl dibandingkan kontrol secara *in vivo*.
- b. Mengetahui ekspresi gen cyclin D pada tikus model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B setelah diberi E-MSCs secara sub

cutan dengan dosis 200 μ l dan 300 μ l dibandingkan kontrol secara *in vivo*.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teori adalah memberikan ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian E-MSCs hypoxia terhadap ekspresi gen p21 dan cyclin D pada tikus model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B.

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah :

1. Memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh E-MSCs hypoxia terhadap ekspresi gen p21 dan cyclin D pada Tikus Galur Wistar *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B.
2. Penelitian lebih lanjut diharapkan dapat diaplikasikan bagi masyarakat.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Yan Zhang <i>et al</i> , 2021 ²⁷	Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor- β receptor inhibition	<i>In vivo</i> , eksperimen	Eksosome yang diisolasi dari umbilical cord blood mengstimulasi penutupan luka dengan menginduksi produksi kolagen melalui jalur TGF-B pada dosis 20ug.
2	Shiqi Hu <i>et al</i> , 2019 ²⁸	Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging	<i>In vivo</i> , eksperimen	Eksosome menyebabkan peningkatan ekspresi prokolagen tipe I dan penurunan ekspresi MMP-1 yang signifikan, terutama melalui penurunan regulasi tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) dan peningkatan regulasi transforming growth factor beta (TGF- β).
3	Yi You <i>et al</i> , 2023 ²⁹	Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy	<i>In vivo</i> , eksperimen	Pemberian eksosom MSCs meningkatkan produksi collagen A1, dan mencegah degradasi ekstra seluler matriks
4	Jing Li <i>et al</i> , 2022 ³⁰	Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit production of extracellular matrix in keloid fibroblasts via downregulating transforming growth factor- β 2 and Notch-1 expression	<i>In vivo</i> , eksperimen	Eksosome dari human adipose-MSCs menghambat produksi ekstraseluler matriks melalui downregulasi TGF-B2 dan Notch-1
5	Raluca Tutuian <i>et al</i> , 2021 ³¹	Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Promote In Vitro Wound Healing by Modulating the Biological Properties of Skin Keratinocytes and Fibroblasts and Stimulating Angiogenesis	<i>In vitro</i> , eksperimen	Eksosome human MSCs menghambat degradasi kolagen melalui penghambatan ekspresi kolagen tipe 1 dan III, serta menghambat ekspresi α -SMA, MMP2, dan MMP13, dan MMP14

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *Exosome* yang telah diisolasi dari *umbilical cord blood* menstimulasi penutupan luka dengan menginduksi *collagen* melalui jalur TGF- β pada dosis 20ug.²⁷ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana E-MSCs akan ditreatment pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UV-B dan dianalisis ekspresi gen p21 dan cyclin D. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa *exosome* menyebabkan peningkatan ekspresi *procollagen type I* dan penurunan ekspresi MMP-1 yang signifikan, terutama melalui penurunan regulasi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan peningkatan regulasi *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β).²⁸ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana E-MSCs akan ditreatment pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UV-B dan dianalisis ekspresi gen p21 dan cyclin D. Penelitian terdahulu menemukan bahwa pemberian *exosome* MSCs meningkatkan produksi *collagen A1*, dan mencegah degradasi ekstra seluler matriks.²⁹ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa *exosome* dari *human adipose-MSCs* menghambat produksi ekstraseluler matriks melalui *down regulasi* TGF-B2 dan Notch-1³⁰. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana E-MSCs akan ditreatment pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UV-B dan dianalisis ekspresi gen p21 dan cyclin D. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *exosome human MSCs* menghambat degradasi *collagen* melalui penghambatan ekspresi *collagen type I dan III*, serta menghambat ekspresi α -SMA, MMP2, dan MMP13, dan MMP14.³¹ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana E-

MSCs akan ditreatment pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UV-B dan dianalisis ekspresi gen p21 dan cyclin D.



BAB II

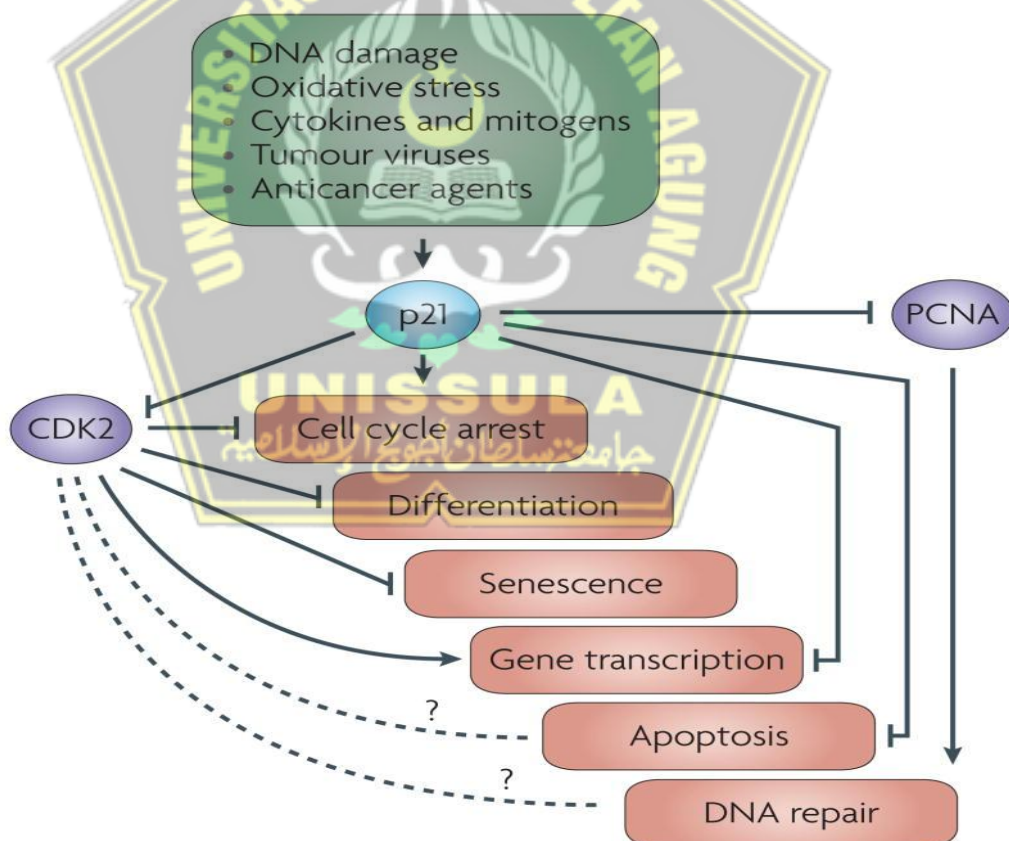
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Protein 21 (p21)

Protein 21 (p21) adalah merupakan protein yang terutama diatur oleh protein p53 dan memiliki peran penting sebagai pengatur siklus sel. Fungsinya dapat ditemukan dalam proses perbaikan struktur DNA yang rusak, induksi apoptosis, dan penghentian siklus sel. Protein ini berkaitan dengan kehamilan, protein 21 (p21) tampaknya diekspresikan dalam sel trofoblast plasenta serta memiliki peran dalam penuaan sel. Protein 21 (p21) adalah anggota penting dari keluarga *inhibitor cyclin-dependent kinase* (CDK). Hal ini tidak hanya berkaitan erat dengan penekanan tumor tetapi juga dapat mengkoordinasikan penuaan sel dengan menghambat aktivitas kompleks CDK. p21 merespons berbagai rangsangan untuk mendorong aktivitas penghambatan pertumbuhan yang terutama bergantung pada kemampuannya untuk menghambat aktifitas kinase dari *Cyclin-Dependent Kinase 2* (CDK2). Penangkapan siklus sel yang diinduksi p21 juga bergantung pada kemampuannya untuk menghambat CDK1.^{32,33,34,35}

p21 dapat menghambat proliferasi sel terlepas dari penghambatan CDK2 dengan menghambat proliferasi antigen inti sel (PCNA), yang diperlukan untuk perkembangan fase S. Beberapa aktifitas anti-proliferasi p21 bergantung pada interaksi ganda protein – protein dan kemampuannya untuk mengatur transkripsi gen. Berbagai respon fisiologis yang dipicu oleh p21 saling berhubungan. Misalnya; penghentian siklus sel yang disebabkan

oleh p21 mendorong perbaikan DNA dengan memberikan waktu yang cukup bagi DNA yang rusak untuk diperbaiki sebelum diteruskan ke sel anak dan merupakan rute utama yang digunakan p21 untuk melakukan aktivitas anti-apoptosisnya. Demikian pula, kemampuan p21 untuk mengatur ekspresi gen penting dalam mendorong penuaan sel. Efek p21 pada transkripsi gen umumnya bersifat penghambatan, namun p21 juga dapat mengaktifkan transkripsi gen dalam kondisi tertentu. Peran p21 dalam mendorong penghentian siklus sel yang disebabkan oleh kerusakan DNA dan bergantung pada p53 telah diketahui dengan baik.³⁶



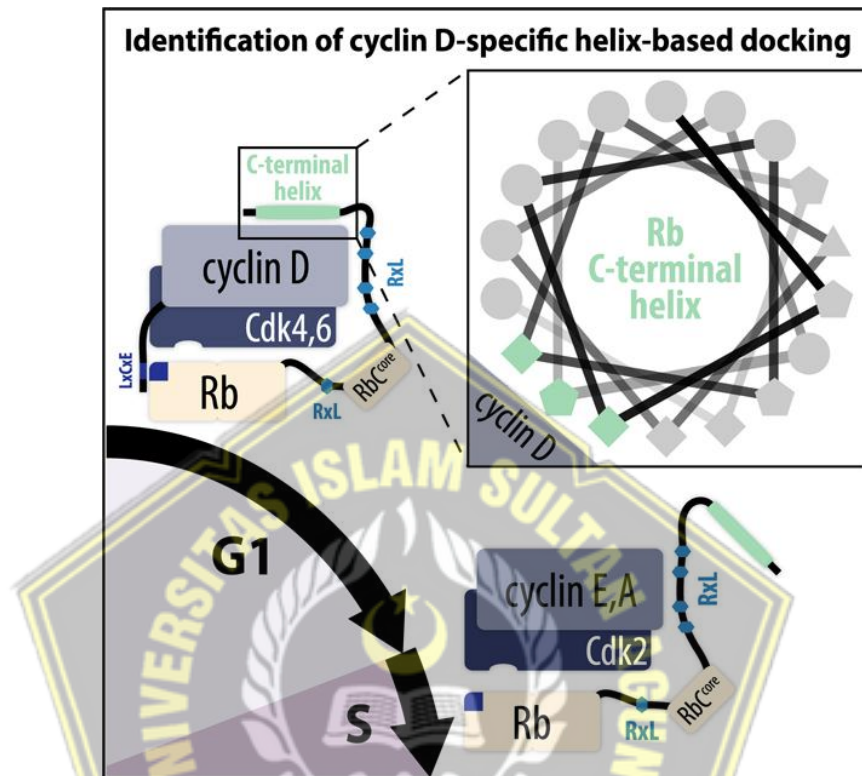
Gambar 2.1. Peran sentral p21 dalam merasakan dan merespon sejumlah besar rangsangan.³⁷

2.2. Cyclin D

Cyclin D adalah anggota keluarga protein cyclin yang terlibat dalam mengatur perkembangan siklus sel. Sintesis cyclin D dimulai selama G1 dan mendorong transisi fase G1/S. Protein Cyclin D memiliki panjang antara 155 - 477 (dalam *Drosophila*)³⁸⁻³⁹. Cyclin D adalah salah satu cyclin utama yang diproduksi dalam hal kepentingan fungsionalnya. Ia berinteraksi dengan empat CDK ; CDK 2 , 4 , 5 dan 6. Dalam proliferasi sel, akumulasi kompleks cyclin D-CDK4/6 sangat penting untuk perkembangan siklus sel. Yaitu ; kompleks cyclin D-CDK4/6 memfosforilasi sebagian protein penekan tumor retinoblastoma (Rb) , yang penghambatannya dapat menginduksi ekspresi beberapa gen (misalnya: cyclin E) yang penting untuk perkembangan fase S. *Drosophila* dan banyak organisme lain hanya memiliki satu protein Cyclin D.

Pada tikus dan manusia , dua protein Cyclin D telah diidentifikasi. Ketiga homolognya yang disebut ; Cyclin D1 , cyclin D2 , dan cyclin D3 diekspresikan pada sebagian besar sel yang berproliferasi dan jumlah relatif yang diekspresikan berbeda pada berbagai tipe sel⁴⁰. Faktor pertumbuhan merangsang RAS /RAF/ ERK yang menginduksi produksi cyclin D. Salah satu anggota jalur MAPK mengaktifkan faktor transkripsi MYC yang mengubah transkripsi gen penting dalam siklus sel, di antaranya adalah cyclin D. Dengan cara ini cyclin D disintesis selama faktor pertumbuhan ada. Tingkat cyclin D dalam sel yang berproliferasi dipertahankan selama faktor pertumbuhan ada, pemain kunci dalam transisi G1/S adalah kompleks

cyclin D-CDK4/6 yang aktif. Cyclin D tidak berpengaruh pada transisi G1/S kecuali jika membentuk kompleks dengan CDK 4 atau 6..⁴¹



Gambar 2.2. Cyclin D-CDK4,6 Mengkomplekskan Target Rb untuk Fosforilasi dengan Memasang Helix C-Terminal..⁴²

2.3. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)

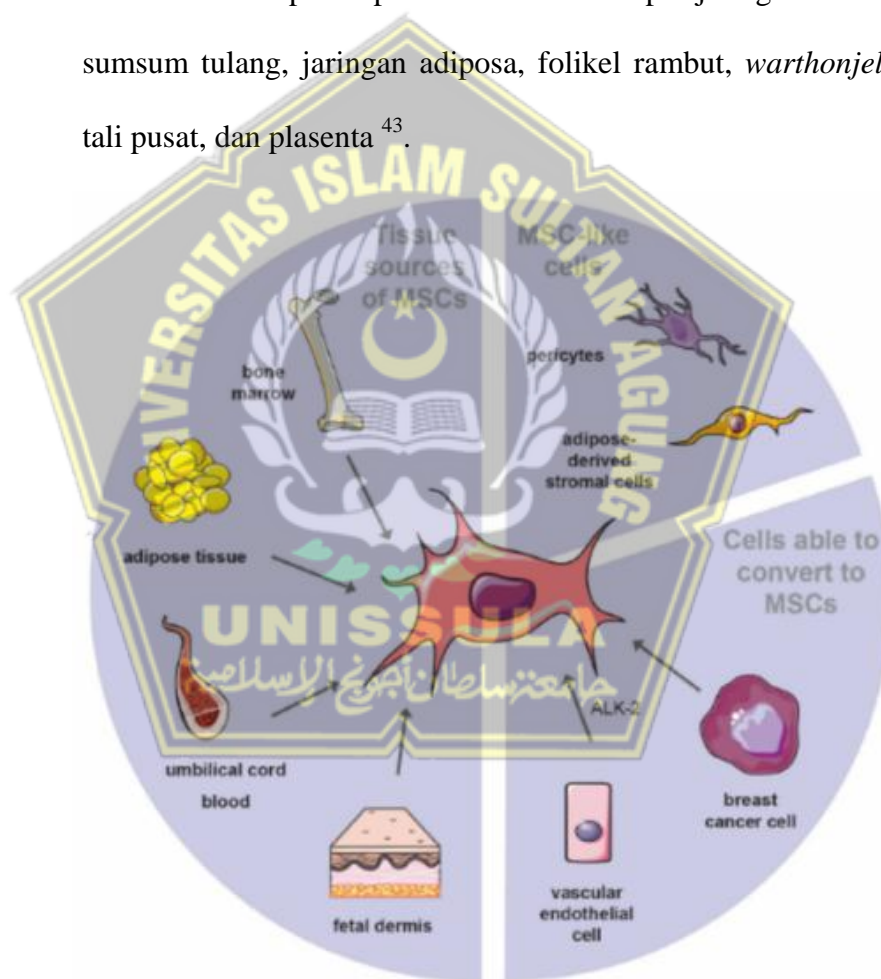
2.3.1. Definisi MSCs

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 pusat⁴³. Secara umum MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel *fibroblast* atau jarum.

Secara *fenotype* MSCs yang diisolasi dari tikus, dimana MSCs tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat *osteogenic* ⁴⁴.

2.3.2. Sumber MSCs

MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta ⁴³.

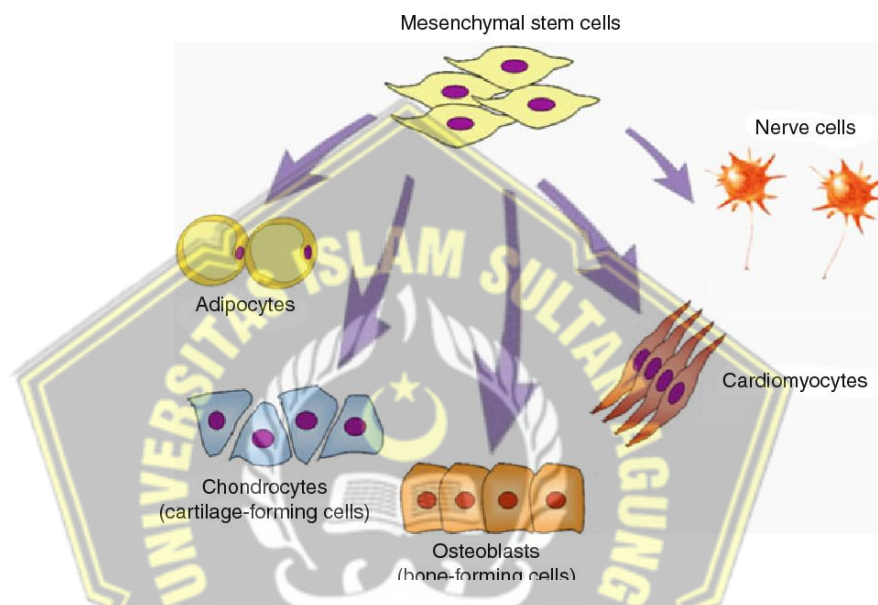


Gambar 2.3. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs) ⁴⁵

2.3.3. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa

sel dewasa seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit⁴⁶. Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekskresi beberapa sitokin baik pro maupun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit⁴⁷.



Gambar 2.4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs⁴⁸

2.3.4. 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^{49,50}.

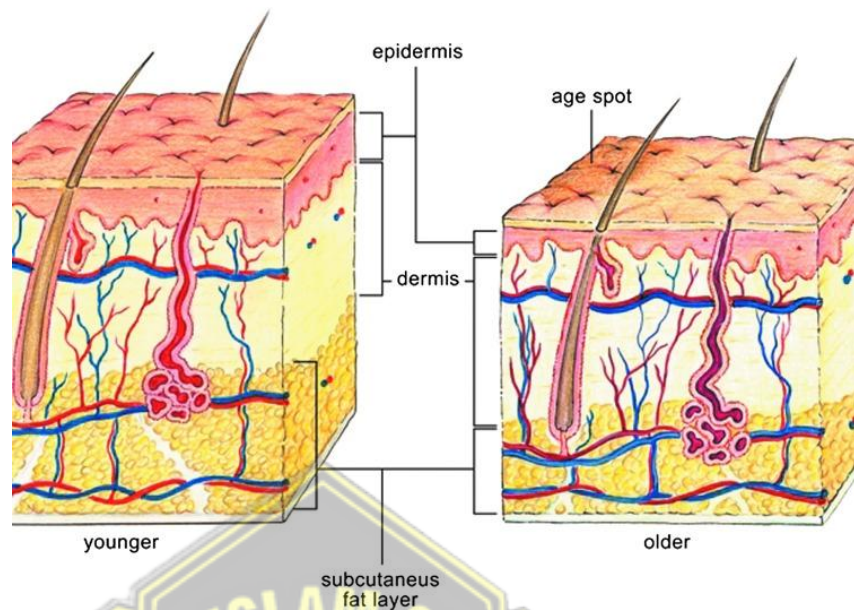
2.4. *Exosome* MSCs

MSCs diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, IL, *Growth Factor* (GF), hormon, *exosome*, mikrovesikel, faktor anti inflamasi dll^{51,52}. 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 ^{53,54}. TGF β memiliki peran kunci dalam regulator sintesis *procollagen I*⁵⁵. Lebih lanjut TGF β menginduksi penundaan aktivasi ERK *signaling pathway*^{55,56}. Disisi lain TGF β menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan MMP tidak aktif sehingga tidak ada degradasi *collagen*⁵⁷. Kandungan IL-10 yang tinggi pada *exosome* dapat menghambat produksi ROS sehingga menurunkan inflamasi dan aktivasi p53^{19,58}.

2.5. Collagen

2.5.1. Definisi

Collagen merupakan protein (polipeptida) ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe *collagen* jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia⁵⁹. *Collagen-1* merupakan jenis serabut *collagen* terbanyak yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit. Serabut *Collagen-1* berperan penting dalam pembentukan jaringan parut. *Collagen-2*, *Collagen-9*, *Collagen-10*, *Collagen-11* ditemukan pada kartilago. *Collagen-3* banyak dijumpai pada ; kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. *Collagen-3* penyebarannya hampir sama dengan *Collagen-1*. Sedangkan *Collagen-7* kebanyakan lokasinya terletak pada *anchoring fibril* di *dermal* ,*epidermal junction* pada kulit, mukosa dan servik. *Collagen-7* juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah⁶⁰.



Gambar 2.5. Perbedaan *Collagen* Pada Kulit Muda dan Kulit Tua. Jumlah *Collagen* pada kulit yang lebih muda lebih banyak dibandingkan kulit yang lebih tua⁶¹.

Telah banyak dibuktikan bahwa tipe *collagen* yang mendominasi organ kulit adalah *Collagen-1* dan *Collagen-3* yang berfungsi pada pertahanan mekanik. Akan tetapi tipe *collagen* lain yang juga ada pada kulit seperti ; *Collagen-5*, *Collagen-6*, *Collagen-7*, *Collagen-12* ditemukan dalam jumlah minimal yang diperkirakan ikut menunjang, akan tetapi peran yang pasti belum jelas⁵⁹. Karena *Collagen-1* yang mendominasi organ kulit, maka *Collagen-1* yang akan diukur pada penelitian kali ini.

Pada umumnya jumlah *collagen* akan berkurang dengan bertambah umur. Akan tetapi beberapa tipe *collagen* mengalami hal yang tidak sama. Pada kulit anak mempunyai banyak *Collagen-3* (biasanya pada jaringan dengan pertumbuhan cepat). Pada proses penuaan intrinsik akan terjadi penurunan *Collagen-3* dan

peningkatan *Collagen-1*. *Collagen-1* terus meningkat sampai umur 35 tahun, saat kulit mencapai puncak kekuatan mekanik, setelah itu *Collagen-1* akan menurun. Hubungan umur dengan jumlah *collagen* sampai saat ini belum jelas, akan tetapi jumlah *collagen* manusia setelah umur 60 tahun secara keseluruhan secara signifikan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kulit umur lebih muda⁶⁰.

Collagen merupakan serat utama pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein yang berfungsi untuk kekuatan mekanik dan penyangga kulit. Semakin bertambah umur maka struktur protein kulit dan komponen kulit lain akan berubah dan hal ini menyebabkan penuaan kulit. Perubahan jumlah *collagen* merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Diperkirakan bahwa akan terjadi penurunan *collagen* sekitar 1% pertahun perunit area kulit akan tetapi pada kulit yang terpapar sinar UV-B dijumpai penurunan sampai 59% seperti yang ditemukan pada kulit yang mengalami *photodamage*⁵⁹.

Walaupun *Collagen-1* merupakan kolagen utama pada lapisan dermis kulit akan tetapi *collagen* tipe lain juga tidak kalah peranan pentingnya. *Collagen-7* yang terbanyak pada *anchoring fibril* terletak pada membrana basalis yang melekatkan membrana basalis ke papila dermis. Pada pasien dengan paparan sinar UV-B kronis akan menurunkan jumlah *Collagen-7* dan akan mengakibatkan

perlekatan antara membrana basalis dengan papilla dermis menurun sehingga ikatan epidermis dan dermis menjadi lemah. Pada satu penelitian didapatkan bahwa kerutan kulit terbentuk akibat lemahnya ikatan antara dermis dan epidermis oleh karena degenerasi *anchoring fibril*. Hal ini ditambah adanya bukti adanya penurunan *Collagen-7* pada dasar kerutan kulit di samping juga ditemukan penurunan *Collagen-4* pada tempat yang sama⁶².

2.5.2. Perubahan pada *collagen*

Pada kulit yang mengalami *Photoaging*, serat *collagen* mengalami disorganisasi. Serabut *collagen* dan kumpulan serat *collagen* berkurang serta mengalami homogenisasi. Kulit yang mengalami *Photoaging* prekursor *Collagen Type I dan III* dan *crosslink*-nya berkurang⁶³. Dengan menggunakan *antibody* terhadap *Collagen Type I*, tidak ditemukan ada perubahan *collagen* setelah radiasi UVB-B selama 10 minggu. Peningkatan *Collagen Type III* dimulai setelah terpapar UVB-B selama 12 minggu (5 hari per minggu dengan ½ MED setiap pemaparan).

Collagen dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik meliputi sinar *ultraviolet*, polusi, dan diet. Faktor ekstrinsik dapat memperberat kerusakan *collagen* yang disebabkan oleh faktor intrinsik. Pengaruh faktor genetika tampak pada studi penuaan kulit pada berbagai etnis. Etnis dengan pigmentasi lebih gelap, seperti ras Afrika-Amerika, memiliki daya perlindungan yang

lebih tinggi terhadap *Ultraviolet*. *Ultraviolet* memicu pembentukan radikal bebas sehingga merusak *collagen* kulit. Kulit ras Afrika - Amerika mengandung lipid interseluler lebih banyak daripada ras Kaukasia sehingga lebih resisten terhadap penuaan. Kerutan wajah pada ras Asia terjadi lebih lambat dan lebih ringan daripada ras Kaukasia⁶¹.

Penurunan *collagen* kulit tampak signifikan pada wanita *menopause*. *Collagen* kulit orang dewasa berkurang 1 % setiap tahun. Penurunan *collagen* ini lebih tampak pada wanita daripada pria. Kulit kendur dan kerutan wajah disebabkan kerusakan akumulasi *collagen*. *Ultraviolet* juga memicu pembentukan radikal bebas, yang dapat bereaksi dengan protein *collagen* sehingga terjadi kerusakan *collagen*⁶⁴.

2.5.3. Mekanisme kerusakan *collagen*

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur *fibroblast* yang menunjukkan bahwa paparan pada kultur *fibroblast* kulit yang mengalami kerusakan akibat *ultraviolet*. Pada kulit yang terlindungi sinar matahari dengan *Collagen Type I* yang terdegradasi sebagian diperoleh melalui percobaan *in-vitro collagen* yang dicampur dengan MMPs yang diinduksi oleh sinar *ultraviolet*, yang terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu; mekanisme secara langsung terjadi degradasi *collagen* secara tidak langsung melalui hambatan sintesis *collagen* oleh degradasi *collagen* yang terbentuk

dari MMP. *Collagen Type I* yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya⁶⁵. Model yang menggambarkan kerusakan akibat paparan sinar UV-B pada jaringan kulit. Paparan *ultraviolet* mengaktifkan faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin pada permukaan *keratinosite* dan *fibroblast*. Reseptor aktif menstimulasi jalur sinyal transduksi dan merangsang faktor transkripsi AP-1, yang mempengaruhi transkripsi gen MMP. Dalam *fibroblast*, AP-1 juga menghambat ekspresi gen *procollagen*. MMP disekresikan oleh *keratinosite* dan *fibroblast* dan memecah *collagen* dan protein lain yang terdapat pada matriks ekstraselular dermis. Perbaikan kerusakan kulit yang tidak sempurna dapat mengganggu integritas fungsional dan struktural dari matriks ekstraseluler. Paparan sinar matahari berulang menyebabkan akumulasi kerusakan *collagen* yang akhirnya menghasilkan kerutan yang spesifik (*photodamage skin*)^{66,67}.

2.5.4. Sintesis Collagen

Awal polipeptida dibentuk di dalam ribosom dari retikulum endoplasma kasar yang disebut rantai *procollagen α*, dimana terjalin dalam sistena retikulum endoplasma sehingga terbentuk *triple helices*. Setiap asam amino ketiga pada rantai α disebut sebagai glisin; dua asam amino kecil lainnya terbanyak di dalam *collagen* dihidroksilasi setelah proses translasi menjadi bentuk hidroksiprolin dan hidroksilisin⁶⁸.

2.5.5. Sintesis *Procollagen*

Bentuk *triple helix* dari rantai α berbentuk molekul *procollagen* seperti sebuah batang, dimana *Collagen Type I* dan *II* berukuran panjang, 300nm dan lebar 1,5nm. Molekul *procollagen* mungkin homotrimerik, dimana ketiga rantainya identik, atau heterotrimerik, dimana dua atau ketiga rantainya memiliki sekuen yang berbeda. Kombinasi dari banyak rantai *procollagen* α sangat bertanggungjawab atas bermacam-macam tipe dari *collagen* dengan struktur dan fungsi yang berbeda. Pada *Collagen Type I, II, III*, molekul *collagen* bersatu dan menjadi berkelompok bersama-sama membentuk fibril⁶⁹.

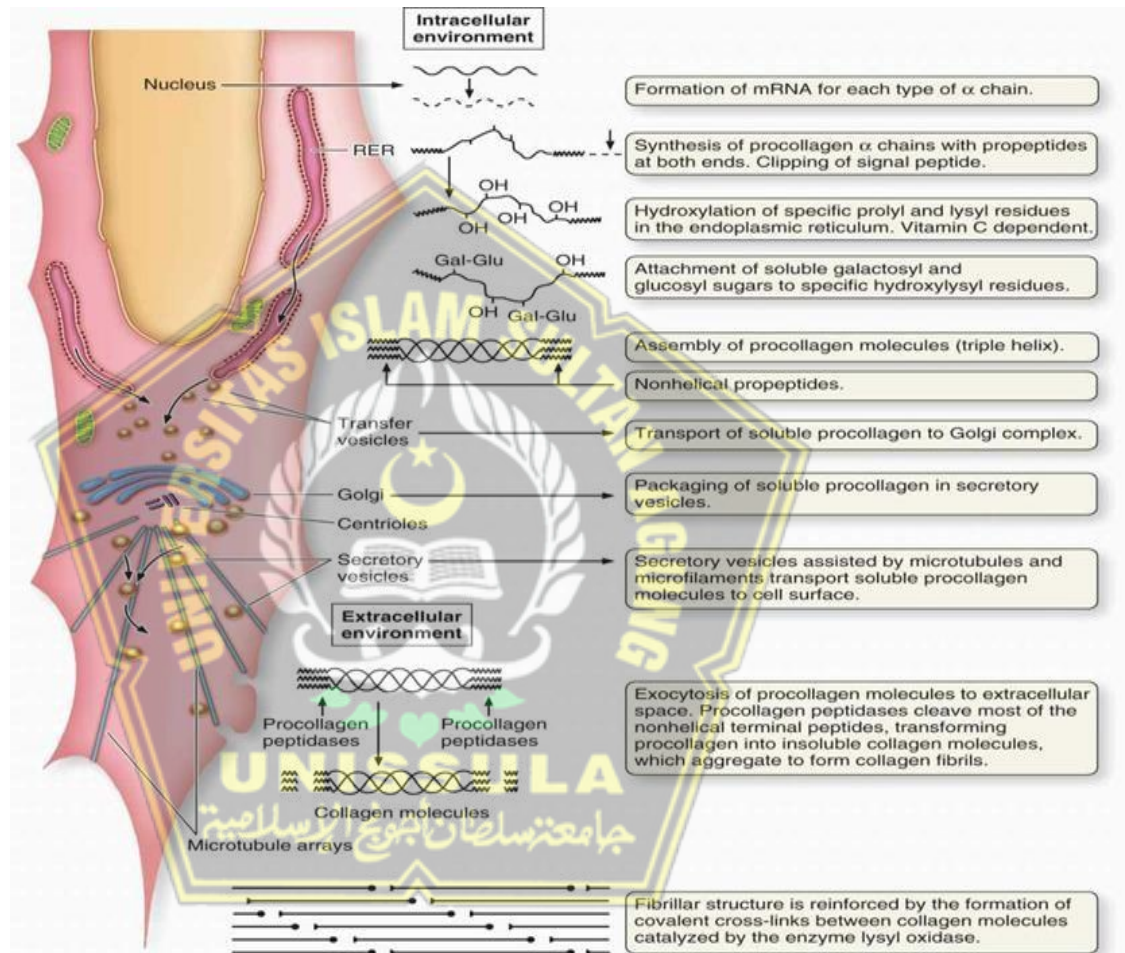
Karena *Collagen Type I* sangat banyak, maka didapatkan banyak penelitian tentang sintesis *collagen* ini. Sintesis ini meliputi beberapa tingkat, dimana disimpulkan pada **gambar 2.6**⁷⁰:

1. Lipetida rantai *procollagen* α diproduksi pada ikatan *polyribosome* yang berikatan dengan membran dari *Reticulum Endoplasma* yang kasar dan ditranslokasi di dalam sisterna dan dilanjutkan dengan sinyal peptide.
2. Hidroksilasi prolin dan lisin diawali sesudah rantai peptide telah mencapai panjang minimum tertentu dan masih terikat pada *ribosome*. Enzim yang menyertai adalah *prolil hidroxilase* dan *lisil hidroxilase* dan reaksi yang membutuhkan O_2 , Fe^{2+} dan asam askorbat (vitamin C) sebagai *Cofactor*.

3. Terjadi glikosilasi pada beberapa sisa hidroksilisin, dengan bermacam-macam tipe dari *collagen* yang memiliki jumlah ikatan *galaktosa-hidroksilisin* yang berbeda-beda.
4. Gugus amino dan karboksil akhir dari setiap rantai α membentuk polipeptida non helix, kadang disebut propeptida ekstensi, dimana membantu rantai α (α_1 , α_2) membentuk dengan posisi yang benar menjadi *triplehelix*. Sebagai tambahan, *propeptida nonhelix* membuat molekul *procollagen* soluble dan mencegah pembentukan intraseluler prematur dan pengendapan dari fibril *collagen*. *Procollagen* ditranspotasikan melalui jaringan golgi dan dieksositosis ke lingkungan ekstraselular.
5. Diluar sel, protease spesifik disebut *peptidase procollagen* menyingkirkan perpanjangan *propeptida*, perubahan dari molekul *procollagen* menjadi molekul *collagen*. Sekarang ini sesuai untuk pembentukan sendiri kedalam *fibril collagen polimerik*, biasanya pada tempat tertentu dekat dengan permukaan sel.
6. Pada beberapa tipe *collagen*, *fibril* berkumpul membentuk *fiber*. Proteoglikan tertentu dan tipe *collagen* (tipe V dan tipe XI) bergabung pada kumpulan molekul *collagen* untuk membentuk *fibril-fibril* dan formasi *fiber* yang berasal dari *fibril* dan berikatan dengan struktur dari komponen-komponen

ekstraselular matrik lainnya.

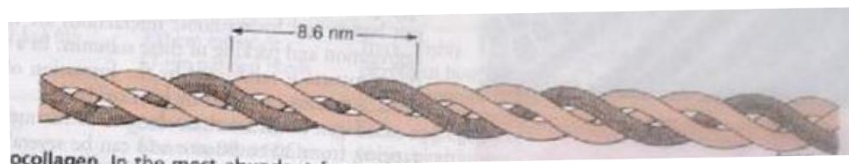
7. Struktur fibriler ditarik oleh formasi kovalen yang berikatan silang antara molekul-molekul *collagen*, sebuah proses dikatalisis oleh enzim *lisil oksidase*.



Gambar 2.6. Sintesis *Collagen*⁷¹

Proses Hidrosilasi dan glikosilasi pada rantai α *procollagen* dan pembentukan menjadi *triple helices* terjadi pada RER (*Rough Endoplasmic Reticulum*) dan pembentukan menjadi fibril terjadi pada *Extracellular Matrix* sesudah mengekskresikan *procollagen*. Karena ada sedikit perbedaan pada gen rantai α *procollagen* dan produksi *collagen* tergantung

pada beberapa kejadian setelah translasi meliputi beberapa enzim lainnya, banyaknya penyakit kegagalan sintesa *collagen* yang telah dijelaskan⁷².



Gambar 2.7. *Procollagen*⁷¹

Bentuk dari *collagen* yang paling banyak, tipe 1, setiap molekul *procollagen* terdiri dari dua rantai peptida yaitu α_1 dan α_2 . Massa 1 buah molekular kira-kira 100 kDa, terjalin *helix* pada sisi kanan dan bergabung bersama oleh interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik. Setiap putaran lengkap dari pilinan *helix*, dengan jarak 8,6 nm. Panjang setiap molekul *procollagen* adalah 300 nm dan lebarnya 1,5 nm⁷¹.

2.6. Efek *Exosome MSCs* terhadap Ekspresi Gen p21 dan Cyclin D pada Tikus yang dipapar Sinar UV-B

Collagen loss adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UV. Penetrasi UV-B pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS dan mengaktifkan protein kinase sehingga mengaktifkan jalur NF-kB dan berujung pada produksi molekul-molekul proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 serta produksi *matrix metalloproteinase* (MMPs) yang menginduksi degradasi *collagen*.⁷³ Paparan sinar UV-B dapat mengaktifkan respon kerusakan DNA yang mengarah pada penurunan ekspresi gen CCND1 atau protein Cyclin D. Sedangkan respon kerusakan DNA dapat meningkatkan aktivasi p21 melalui p53. Respon ini bertujuan

untuk mencegah transisi dari fase G1 ke fase S (*cell cycle arrest*) dan memungkinkan sel untuk memperbaiki kerusakan DNA sebelum melanjutkan siklus sel.

Exosome-MSCs diyakini sebagai terapi yang menjanjikan dalam pengobatan regeneratif, dengan menghindari tumorigenitas dan penolakan imun. Proses biologis SASP berkaitan erat dengan penuaan seluler. Kerusakan DNA mengaktifkan p53, yang dapat menyebabkan peningkatan p21, yang merupakan pos pemeriksaan dalam fase G1 dari siklus sel dan terlibat dalam regulasi siklus sel. p21 juga dapat mengatur CDK2 untuk menghambat inaktivasi fosforilasi Cdh1, target EHMT1, dan *histone methyltransferases* EHMT2, menghambat pembungkaman promotor IL-6 dan IL-8, dan meningkatkan transkripsinya. Pensinyalan RAS mengaktifkan faktor transkripsi CEBPB dan mengatur transkripsi IL-6 dan IL-8. IL1A adalah komponen kecil SASP, dan transkripsinya diatur oleh kompleks AP-1 (C-FOS, C-JUN). Faktor terkait SASP dapat diklasifikasikan menjadi faktor SASP yang memerlukan reseptor, bertindak langsung, dan mengatur. Faktor SASP yang memerlukan reseptor termasuk interleukin (IL-1, IL-6, IL-8), kemokin (CXCL-1, CCL-2), dan faktor pertumbuhan (FGF, TGF). Faktor SASP yang bertindak langsung termasuk MMP dan serin protease (uPA, tPA). Faktor pengatur SASP termasuk *inhibitor aktivator plasminogen*, *inhibitor metalloproteinase* jaringan, dan protein pengikat faktor pertumbuhan seperti insulin.

Exosome adalah jenis vesikel ekstraseluler (diameter 30-150 nm) yang disekresikan oleh MSCs. *Exosome* yang diturunkan dari MSCs mengandung berbagai molekul bioaktif termasuk protein, RNA (mRNA, miRNA), lipid, dan faktor pemberi sinyal lainnya. *Exosome* yang diturunkan dari MSC dapat mengurangi produksi ROS dan kerusakan oksidatif pada berbagai jenis sel, termasuk keratinosit dan sel kulit yang terkena radiasi UV. Kandungan miRNA di dalam *exosome* dapat meningkatkan ekspresi gen CCND1 atau protein *Cyclin D* baik dengan meningkatkan aktivitas transkripsi atau melalui penghambatan *inhibitor Cyclin D*. Salah satu inhibitor *Cyclin D* yaitu protein p21. MiRNA yang terdapat pada *exosome* MSCs dapat menghambat transkripsi gen p21 dengan mengikat pada *silencer* bagian promotor gen p21 atau dengan meningkatkan degradasi mRNA p21 untuk terdegradasi sehingga tidak bisa ditranslasi menjadi protein p21 aktif. Peningkatan *Cyclin D* dan terhambatnya p21 dapat mendorong sel untuk melanjutkan siklus sel setelah DNA damage repair, yang penting untuk reparasi dan regenerasi jaringan.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

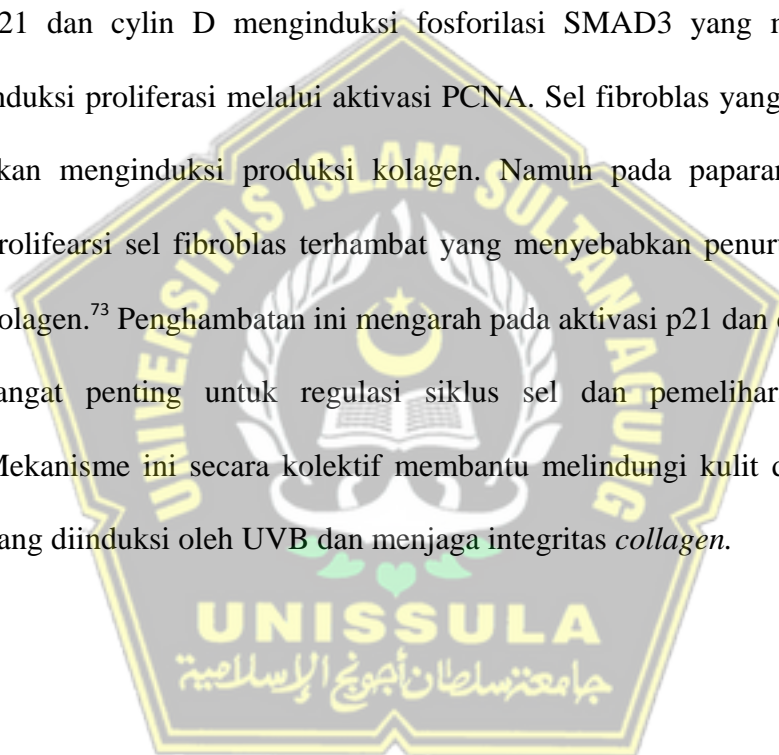
Sinar UV-B menyebabkan kerusakan langsung pada DNA dan komponen seluler lainnya, yang mengarah pada produksi ROS. ROS ini termasuk radikal bebas seperti superoksida ($O_2^{\bullet-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($\bullet OH$). ROS yang dihasilkan oleh UVB dapat mengaktifkan jalur kinase yang diatur oleh mitogen (MAPK). Tiga jalur utama MAPK yang terlibat adalah ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), dan p38 MAPK. Aktivasi JNK, salah satu jalur MAPK, secara khusus mengarah pada fosforilasi dan aktivasi c-Jun, yang merupakan komponen dari faktor transkripsi AP-1 (*Activator Protein-1*). Kompleks AP-1 yang terdiri dari c-Jun/c-Fos mengikat elemen respons AP-1 pada promotor gen target, termasuk cyclin D. Aktivasi AP-1 oleh c-Jun/c-Fos meningkatkan transkripsi cyclin D, yang pada gilirannya mempromosikan progresi siklus sel dan proliferasi sel fibroblast.

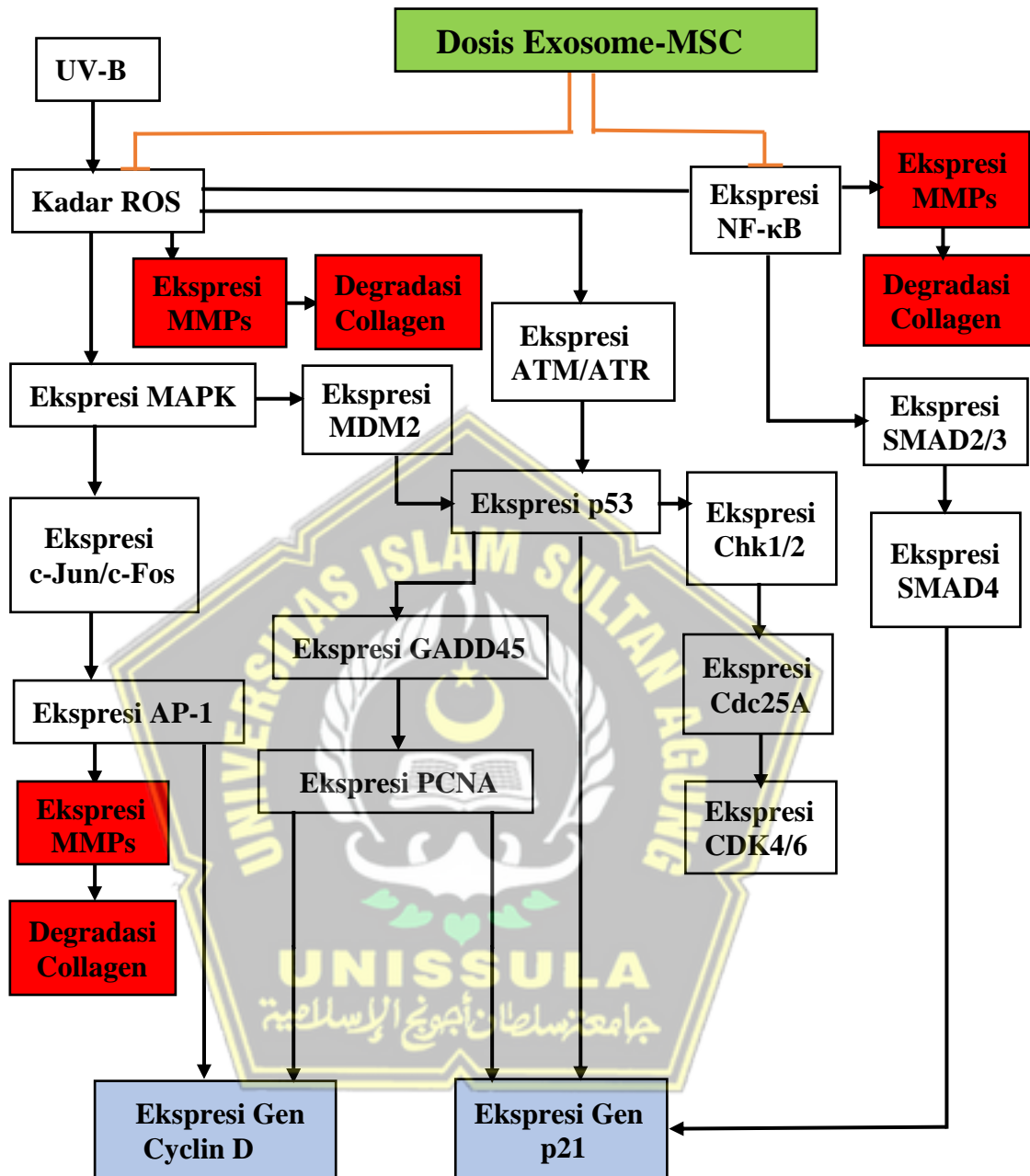
Disisi lain, ROS yang dihasilkan oleh UVB dapat menyebabkan kerusakan DNA, yang kemudian sinyalnya akan direspon oleh protein sensor kerusakan DNA seperti ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) dan ATR (*ATM and Rad3-related*). ATM dan ATR adalah kinase yang diaktifkan sebagai respons terhadap kerusakan DNA. Setelah diaktifkan, ATM dan ATR akan memfosforilasi berbagai target protein, termasuk p53.

Fosforilasi p53 oleh ATM/ATR meningkatkan stabilitas dan aktifitas transkripsional p53. p53 yang teraktivasi akan menginduksi ekspresi berbagai gen target yang terlibat dalam respons terhadap kerusakan DNA, termasuk gen yang mengkode protein p21 dan GADD45. GADD45 dapat berinteraksi dengan PCNA untuk memfasilitasi regulasi cyclin D. p53 juga dapat mengatur ekspresi p21 secara tidak langsung melalui *non canonical pathway* pada berbagai jalur sinyal seluler. p53 dapat meningkatkan atau menekan aktivitas faktor transkripsi lain seperti NF- κ B, SP1, atau E2F, yang pada gilirannya dapat meningkatkan atau menurunkan ekspresi p21. Selain itu, p53 dapat mempengaruhi aktivitas berbagai protein kinase seperti MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) atau PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase). Perubahan aktivitas kinase ini dapat mengubah sinyal downstream yang mempengaruhi ekspresi p21.

ROS dapat mengaktifkan enzim I κ B kinase (IKK). IKK kemudian memfosforilasi inhibitor dari NF- κ B, yaitu I κ B. Fosforilasi I κ B mengarah pada degradasi proteasomal dari I κ B, melepaskan NF- κ B. NF- κ B kemudian berpindah ke inti sel dan menginduksi transkripsi gen target seperti SMAD2/3 dan mengaktifkan SMAD4. Fosforilasi SMAD2/3 berikatan dengan SMAD4, membentuk kompleks heteromerik yang berpindah ke inti sel. Di dalam inti, kompleks ini berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen target. Salah satu gen target yang diinduksi oleh kompleks SMAD2/3/4 adalah p21 (CDKN1A) yaitu inhibitor siklus sel yang menghambat aktivitas cyclin-dependent kinase (CDK), yang

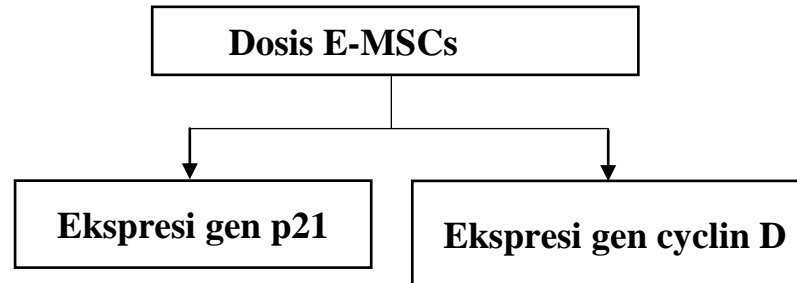
mengontrol kemajuan siklus sel. p21 menginduksi henti siklus sel pada fase G1/S, mencegah proliferasi sel. Penurunan produksi *collagen* oleh fibroblast akibat henti siklus sel yang diinduksi oleh p21 dapat menyebabkan degradasi atau penipisan matriks ekstraseluler. *Exosome* yang berasal dari MSCs mencegah kehilangan *collagen* yang diinduksi oleh UV-B terutama dengan mengurangi produksi ROS dan menghambat jalur NF- κ B. Aktivasi p21 dan cyclin D menginduksi fosforilasi SMAD3 yang menyebabkan induksi proliferasi melalui aktivasi PCNA. Sel fibroblas yang berproliferasi akan menginduksi produksi kolagen. Namun pada paparan sinar UVB, proliferasi sel fibroblas terhambat yang menyebabkan penurunan produksi kolagen.⁷³ Penghambatan ini mengarah pada aktivasi p21 dan cyclin D, yang sangat penting untuk regulasi siklus sel dan pemeliharaan *collagen*. Mekanisme ini secara kolektif membantu melindungi kulit dari kerusakan yang diinduksi oleh UVB dan menjaga integritas *collagen*.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

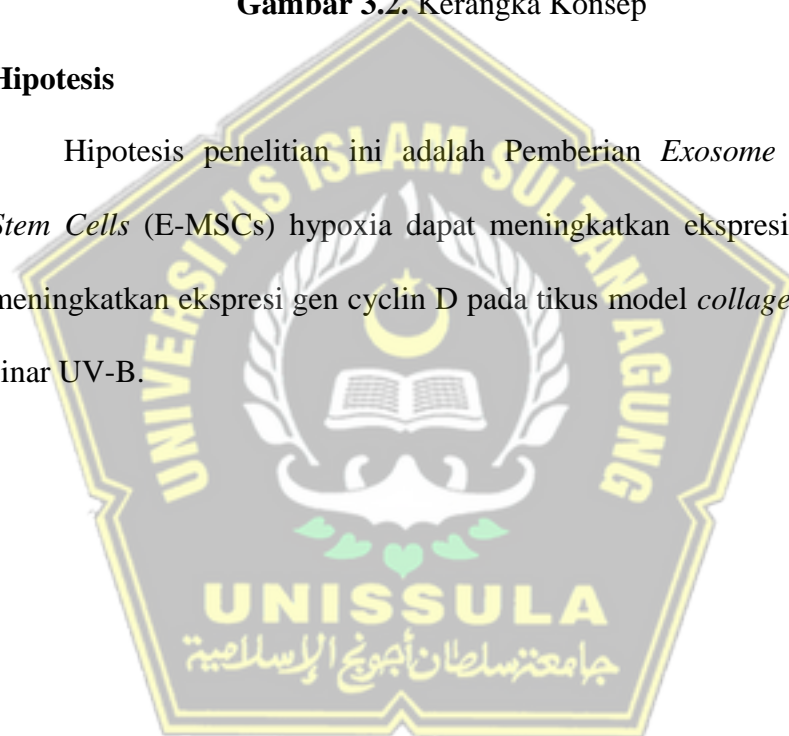
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah Pemberian *Exosome Mesenchymal Stem Cells* (E-MSCs) hypoxia dapat meningkatkan ekspresi gen p21 dan meningkatkan ekspresi gen cyclin D pada tikus model *collagen loss* dipapar sinar UV-B.



BAB IV

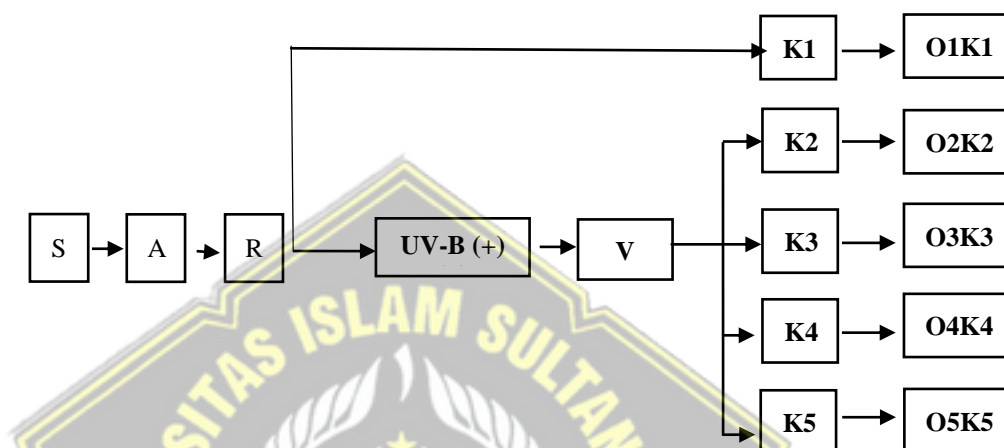
METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* yang menggunakan rancangan penelitian berupa *Post Test Only Control Group* dengan metode rancang acak lengkap menggunakan hewan coba tikus sebagai objek penelitian yang dipapar sinar UV-B. Pemilihan *Post Test Only Control Group Design* dilakukan karena desain ini memungkinkan evaluasi efek paparan sinar UV-B pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol secara terpisah pada akhir penelitian, sehingga memungkinkan identifikasi perbedaan akibat intervensi perlakuan E-MSCs tersebut. Dengan menggunakan kelompok kontrol yang tidak diberi intervensi perlakuan pasca terpapar sinar UV-B, penelitian dapat lebih spesifik dalam menilai dampak langsung dari E-MSCs terhadap paparan sinar UV-B terhadap tikus objek penelitian yang mengalami *collagen loss*. Objek penelitian adalah Tikus jantan Galur Wistar dengan berat badan 200-250 gr dengan 5 kelompok penelitian dengan rincian sebagai berikut (Gambar 4.1) :

1. K1 (Tikus sehat tanpa penyinaran UV-B),
2. K2 (Kontrol negatif = Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan, NaCl 0,9% secara sub cutan)
3. K3 (Kontrol positif = Tikus dipapar UV-B dengan pemberian kontrol positif *Hyaluronic Acid* (HA) Staris® dosis 200uL secara sub cutan.

4. K4 (Tikus dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs 200uL secara sub cutan),
5. K5 (Tikus dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs 300uL secara sub cutan).



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Sample

A : Aklimatisasi

R : Randomisasi

V : Validasi densitas *collagen* dengan menggunakan *Masson Trichome*

K1 : Tikus sehat tidak diberi perlakuan

K2 : Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan, NaCl 0,9% sub cutan

K3 : Tikus dipapar UV-B diberi perlakuan HA dosis 200uL secara sub cutan

K4 : Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara sub cutan

K5 : Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara sub cutan

O1K1 : Observasi ekspresi gen p21 dan Cyclin D pada Kelompok 1

O2K2 : Observasi ekspresi gen p21 dan Cyclin D pada Kelompok 2

O3K3 : Observasi ekspresi gen p21 dan Cyclin D pada Kelompok 3

O4K4 : Observasi ekspresi gen p21 dan Cyclin D pada Kelompok 4

O5K5 : Observasi ekspresi gen p21 dan Cyclin D pada Kelompok 5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

E-MSCs dosis 200uL dan 300uL secara sub cutan.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat : ekspresi gen p21 dan gen Cyclin D

4.2.1.3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah sinar UV-B.

4.2.1.4. Variabel Terkendali

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

4.2.2. Defenisi Operasional

4.2.2.1. E-MSCs

E-MSCs adalah vesikel yang terbentuk dari fusi endosomal badan multivesikuler dengan plasma membran MSCs. E-MSCs dihasilkan melalui isolasi dari kultur MSCs *passage* ke -4 dengan metode sentrifugasi. E-MSCs kemudian di simpan dalam suhu 2-8⁰C.

4.2.2.2. Injeksi sub cutan E-MSCs

Injeksi sub cutan E-MSCs adalah Exosome dari MSCs yang telah di sentrifugasi dan di sterilisasi dengan

metode filtrasi melalui nilon filter 0,22um dan di tempatkan pada spuit 1 ml dengan needle 26G untuk diinjeksikan secara sub cutan yaitu pada punggung tikus model dengan dosis 200uL dan 300uL.

Satuan: uL (mikroliter)

Skala: rasio

4.2.2.3. Ekspresi gen p21

p21 adalah protein yang terutama diatur oleh protein p53 dan memiliki peran penting sebagai pengatur siklus sel yang dianalisis dari kulit yang diambil pada hari ke 29. Sampel jaringan kulit sebanyak 5 mg 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. Pengukuran dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia. Satuan: Ekspresi relatif (Ekspresi Gen p21/ekspresi house keeping Gen GAPDH)

Skala : Rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen Cyclin D

Cyclin D adalah anggota keluarga protein cyclin yang terlibat dalam mengatur perkembangan siklus sel sebagai penyeimbang akibat tingginya kadar ROS iradiasi UV-B yang dianalisis dari kulit yang diambil pada hari ke 29.

Sampel jaringan kulit sebanyak 5 mg 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. Pengukuran dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia.

Satuan: Ekspresi relatif (Ekspresi Gen cyclin D / ekspresi house keeping Gen GAPDH.

Skala : Rasio

4.2.2.5. Sinar UV-B

Dalam penelitian ini, sinar UV-B merujuk kepada radiasi UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B *narrowband* tipe TLF72-100W/12. Paparan sinar UV-B dilakukan selama 5 hari. Dosis paparan sinar UV-B dengan UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *Minimal Erythema Dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari dengan jarak 20cm selama 5 kali seminggu pada hari ke 1, 2, 4, 5, dan 7 selama 2 minggu⁷⁴.

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram yang

dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang diperoleh dari SCCR Indonesia yang dipapar sinar UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari dengan jarak 20cm selama 5 kali seminggu pada hari ke 1, 2, 4, 5, dan 7 selama 2 minggu⁷⁴ hingga berkurangnya densitas *collagen*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tikus putih jantan Galur Wistar yang mengalami *collagen loss* akibat paparan UV-B.
2. Umur 2-3 bulan.
3. Kondisi sehat.
4. Berat 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. Tidak mengalami *collagen loss*.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan Galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K1 (tikus sehat tanpa paparan UV-B), K2 (tikus dipapar UV-B tanpa perlakuan), K3 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HA dosis 200uL secara sub cutan), K4 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs dosis 200uL secara sub cutan) dan K5 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs dosis 300uL secara sub cutan)

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel dilakukan dengan rumus sampel eksperimental dari *Federer* yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ sehingga didapat hasil 15. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan.

Rumus *Federer* : $(t-1)(n-1) \geq 15$

Sampel tiap Kelompok : $(5-1)(n-1) \geq 15$

$$4n-4 \geq 19$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Keterangan:

t = banyaknya perlakuan

n = banyak sampel setiap perlakuan

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 5 ekor tikus perkelompok, dengan tambahan 1 tikus perkelompok sebagai cadangan.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa:

1. UV *light* (broadband dengan *peak emission* pada 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm^2
2. Pisau cukur
3. Kandang paparan
4. Kandang pemeliharaan
5. Tempat air minum tikus
6. Pemotong rambut
7. *Vacutainer*
8. Tabung hematokrit
9. 6 mm *biopsy punch*
10. Sentrifuge
11. Mikropipet 1
12. 1000 uL mikropipet tip
13. *vial tube* 1,5 mL
14. *PCR machine illumina*

15. Mikroskop
16. *Staining jar*
17. *Coated desk glass*
18. *Cover glass*
19. Laptop.

4.4.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan yang terdiri :

1. Ketamin
2. *Xylazine*
3. Etanol
4. Aquades
5. Oroform
6. *Primer p21*
7. *Primer Cylin D*

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Penelitian dimulai dengan pengajuan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang. Langkah ini diambil setelah mendapatkan persetujuan proposal penelitian dari pembimbing dan penguji. Permohonan persetujuan etik ini diperlukan untuk memastikan bahwa penelitian dilakukan sesuai dengan prinsip-prinsip etika

dalam penggunaan hewan percobaan. Selain itu, persetujuan etik juga menjamin bahwa perlakuan terhadap hewan coba akan dilakukan dengan memperhatikan kesejahteraan dan hak-hak hewan, serta meminimalkan penderitaan yang tidak perlu.

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* beserta janin tikus dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* beserta janin tikus diletakkan ke petri dish, kemudian dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.

7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan 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 diresuspendi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.
2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen *Flow Cytometry* (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.

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 kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam *flow cytometry*

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

4.5.4. Isolasi *Exosome* MSCs hypoxia

1. *Condition medium* yang sudah dikoleksi dari passage 4, kemudian di sentrifuge 300xg selama 5 menit untuk menghilangkan sel, selanjutnya di sentrifuge 2000xg selama 30 menit untuk menghilangkan debris.
2. *Supernatant* yang sudah di sentrifuge kemudian di filtrasi dengan metode TFF (*Tangential Flow Filtration*) menggunakan *sterile hollow fiber polyether-sulfone membrane* 10, 50, 500 kD.

3. MSCs yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
4. Flask yang telah berisi MSCs kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
5. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oksigen-meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
6. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
7. *Chamber* yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration* (TFF) untuk mendapatkan hipoksia MSCs-Exosome.
9. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500µl *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
10. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

4.5.5. Penyinaran UV-B dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kg BB) dan xylazine (20mg/kg BB).

2. Rambut pada bagian punggung tikus di potong hingga bersih.
3. Punggung tikus dipapar dengan UV *light* (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari selama 5 hari⁷⁴.
4. Tikus K3 kemudian diberi perlakuan secara subkutan menggunakan E-MSCs yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari. Tikus pada K4 diberi perlakuan secara sub cutan menggunakan E-MSCs yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari.

4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan sampel jaringan untuk analisis RT-PCR dilakukan pada hari ke 29 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UV-B. Sampel jaringan dibagi menjadi dua untuk difiksasi dengan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam dan untuk dimasukkan ke dalam RNA Later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian disimpan dalam suhu -80°C hingga proses analisis RT-PCR

4.5.7. Pembuatan Blok Parafin.

1. Dehidrasi

Masukan potongan jaringan dalam alkohol bertingkat dari 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Masukan jaringan ke dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam kemudian masukan jaringan pada larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

2. Parafinisasi dan Embedding

Masukan jaringan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam. Tunggu hingga parafin memadat, potong jaringan dalam parafin setebal 4 mikron dengan mikrotom. Hasil dari potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Masukan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.8. Validasi Berkurangnya *Collagen* Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan *Collagen*

Pengecatan *collagen* dilakukan dengan menggunakan metode pengecatan *Masson Trichome* dengan tahapan sebagai berikut :

1. Slide jaringan dideparafinisasi.
2. Cairan Bouin dipanaskan pada suhu 54-64°C.

3. Slide diinkubasi dalam Cairan Bouin yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
4. Slide diinkubasi dalam Hematoxylin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian bilas dengan air.
5. Slide diinkubasi dalam larutan *Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin* selama 15 menit, kemudian dibilas dengan air.
6. Slide diinkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat selama 10-15 menit.
7. Slide diinkubasi dalam larutan *Aniline Blue* selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air.
8. Slide diinkubasi dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit.
9. Slide dilakukan proses dehidrasi, kemudian pasang *desk glass*.
10. Interpretasi hasil :
 - a. Jaringan Normal : Pada jaringan normal yang sehat, *collagen* biasanya terlihat jelas dengan warna biru atau hijau yang intens.
 - b. *Collagen-loss* : Penurunan *collagen* akan terlihat sebagai pengurangan intensitas warna biru atau hijau. Area yang seharusnya mengandung *collagen* mungkin terlihat lebih pucat atau bahkan kehilangan warna biru/hijau sama sekali.

4.5.9. Analisis Kuantitatif Ekspresi gen p21 dan cyclin D menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA syntesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad). Penentuan Ekspresi Gen p21 dan Cyclin D

2. Penentuan Ekspresi Gen p21 dan cyclin D

Gen p21 dan Cyclin D diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (Invitrogen Life Technologies®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti 96.

4.6. Langkah Penelitian

1. Persiapkan 30 ekor tikus jantan strain wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram yang telah diadaptasi selama 7 hari.
2. Bius tikus dengan campuran ketamin dan xylazine
3. Cukur punggung tikus seluas 2x3 cm
4. Lakukan penyinaran pada punggung tikus dengan sinar UV-B dengan dosis minimal UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm)

dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari sebanyak 5 kali seminggu selama 2 minggu dengan jarak 20cm⁷⁴.

5. Setelah tikus yang terpapar UV-B tervalidasi mengalami collagen loss, berikan perlakuan pada tikus sesuai kelompoknya K1, K2, K3, K4, dan K5 sebanyak 1 kali pada hari ke 15 hari.
6. Hari ke-29, tikus diterminasi dan diambil biopsy jaringan kulit yang terpapar UV-B untuk pemeriksaan qRT-PCR
7. Periksa ekspresi p21 dan Cyclin D menggunakan qRT-PCR adalah sebagai berikut:
 - a. Isolasi RNA: isolasi RNA dari sampel kulit dengan menggunakan trizole RNA isolation reagen, tambahkan kloroform dan vortex hingga homogen. Selanjutnya dilakukan setrifugasi dengan kecepatan 12.000G selama 15 menit untuk mengisolasi fase air yang mengandung RNA. Fase air yang mengandung RNA dimurnikan dengan isopropanol dan dipisahkan dengan sentrifugasi kembali. Pelet yang terbentuk dari hasil sentrifugasi dicuci dengan etanol.
 - b. Sintesis cDNA: Sintesis cDNA dilakukan dengan cDNA sintesis kit II menggunakan alat PCR. RNA yang telah diisolasi dihitung kadarnya dengan nanodrop dan dilakukan sintesis cDNA.
 - c. Analisis qRT-PCR: Analisis qRT-PCR dengan menggunakan primer spesifik p21 dan Cyclin D dengan menggunakan reagen sybr green II.

- d. Analisis Data: Hasil cq value pada analisis qRT-PCR dibandingkan dengan housekeeping gen GAPDH dan dihitung nilai persentasenya.

4.7. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Jawa Tengah. Penelitian rencana akan dilakukan pada Juni – Juli 2024.

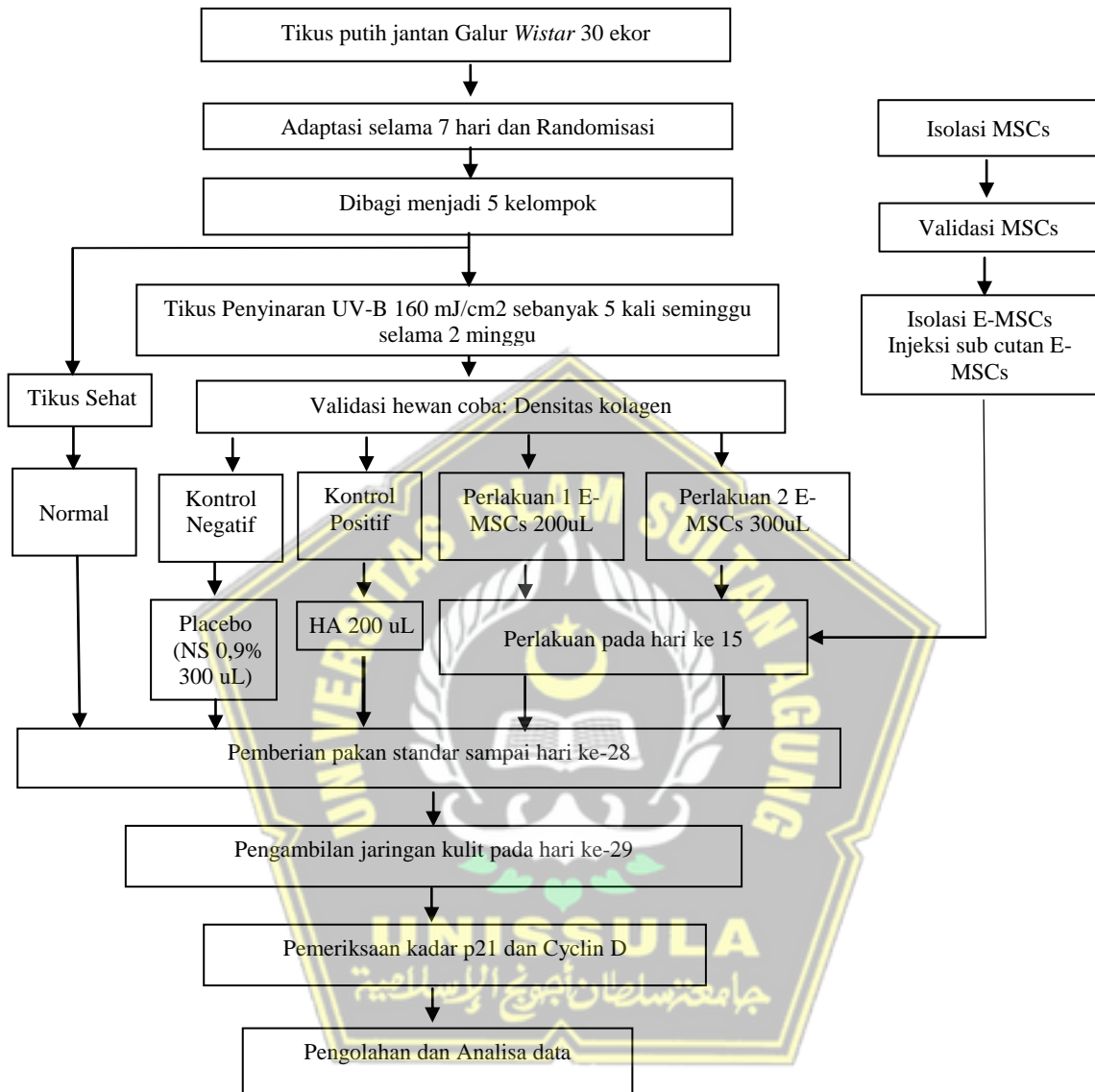
4.8. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Uji ekspresi gen α -SMA diperoleh data normal ($P > 0,05$), namun tidak homogen ($P < 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Data densitas kolagen memiliki sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$

menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.



4.9. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

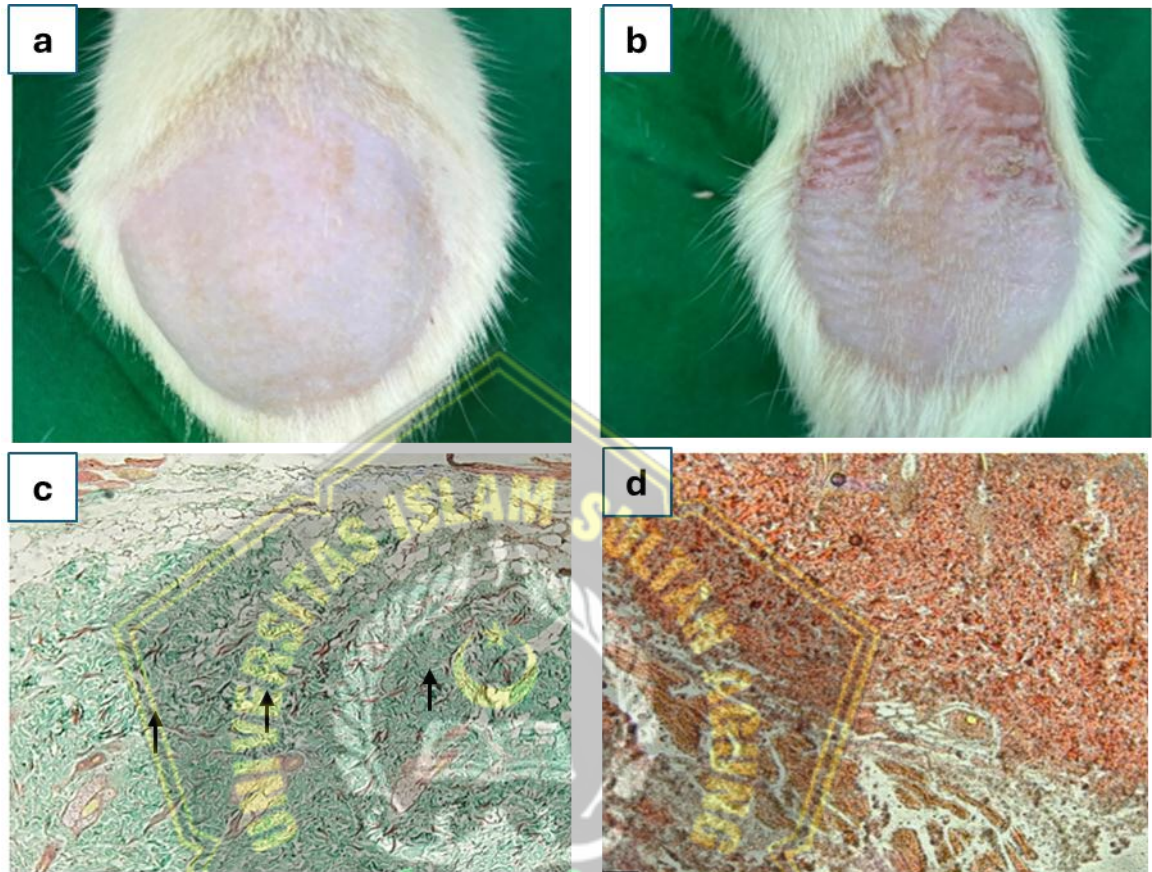
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Eksperimental dilakukan pada bulan Juni sampai Juli 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang Indonesia. Subjek penelitian yaitu tikus jantan galur wistar dengan berat badan 200-250 gram dan berumur 2-3 bulan yang di induksi sinar UV-B 302 nm dengan intensitas energi 160 mJ/cm. Penelitian menggunakan 30 ekor tikus jantan dan tidak ada tikus *drop out* selama penelitian berlangsung. Penelitian terdiri dari 5 kelompok yaitu kelompok (K1) kontrol tikus sehat tanpa perlakuan , kelompok (K2) kontrol negatif pemberian NS 0,9% , kelompok (K3) kontrol positif adalah 6 hewan coba yang diberikan injeksi *sub cutan Hyaluronic Acid (HA)* dosis 200 μ L, kelompok (K4) terdiri dari 6 hewan coba dengan pemberian injeksi *sub cutan E-MSCs* dosis 200 μ L dan kelompok (K5) terdiri dari 6 hewan coba dengan pemberian injeksi *sub cutan E-MSCs* dosis 300 μ L.

Pengamatan secara makroskopis dilakukan untuk melihat adanya *Collagen loss* akibat paparan sinar UV-B dan berdasarkan hasil pengamatan terlihat adanya *Collagen loss* pada mencit yang terpapar sinar UV-B dibandingkan dengan yang tidak terpapar sebagaimana terlihat pada (**Gambar 5.1**). Selain itu untuk memperkuat validasi, analisis secara anatomi dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *Masson Trichome* untuk melihat densitas elastin akibat paparan sinar UV-B. Berdasarkan penelitian terdahulu, elastin dapat terlihat sebagai gambaran merah dengan pewarnaan *Masson Trichome*. Berdasarkan hasil pengamatan secara anatomi didapatkan hasil bahwa terjadi *Collagen loss* pasca paparan

sebagaimana yang ditunjukkan pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1. Tikus kelompok sehat tidak terdapat kemerahan dan kerutan (A) , Tikus yang terpapar UV-B tanpa perlakuan tampak memerah dan kerutan (B), *Masson Trichome* dengan warna biru yang menandakan adanya produksi *Collagen* (C), Kulit Tikus yang terpapar UV-B dengan menunjukkan warna merah yang menandakan degradasi *Collagen* (*Collagen loss*) (D). *Panah hitam menunjukkan deposisi kolagen.

5.1. Hasil Penelitian

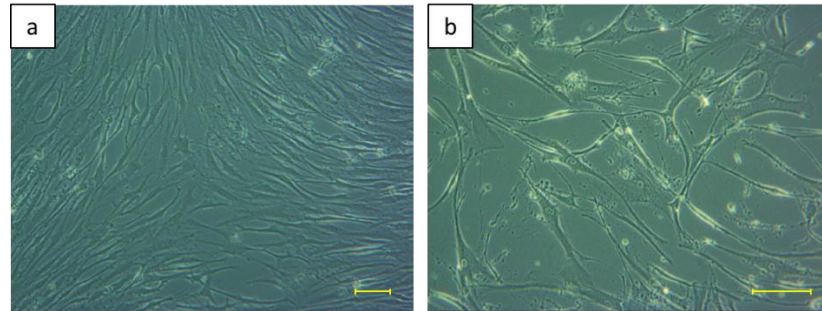
5.1.1. Hasil Validasi MSCs

Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang Indonesia, menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 19 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask kultur dengan medium khusus. Hasil

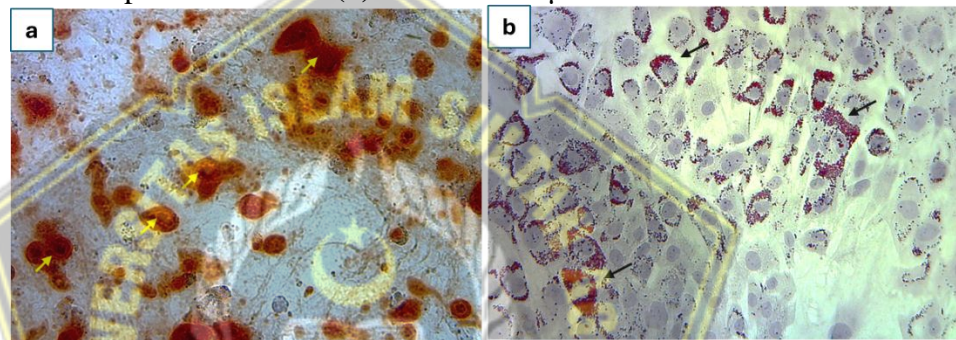
kultur MSCs setelah pasage ke-4 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle shape*

5.1.1.1. Diferensiasi Osteogenik dan Adipogenik

Sel MSCs dikultur dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik selama 14 hari untuk mengetahui kemampuan diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit. Berdasarkan pengamatan mikroskop pada perbesaran 100x dan 200x, morfologi sel kultur hasil isolasi memiliki bentuk lonjong, panjang, inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol yang menyerupai fibroblast dan melekat pada dasar flask plastik (*plastic adherent*) (**Gambar 5.2**). Gambaran diferensiasi osteogenik MSCs ditunjukkan oleh sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarin Red* (**Gambar 5.3a**). Diferensiasi adipogenik MSCs ditunjukkan oleh sel yang berisi akumulasi droplet lipid dengan pewarnaan *Oil Red O* (**Gambar 5.3b**). Deposisi kalsium dan lemak hasil diferensiasi MSCs menjadi osteosit dan adiposit ditunjukkan dengan warna merah pada masing-masing kultur.



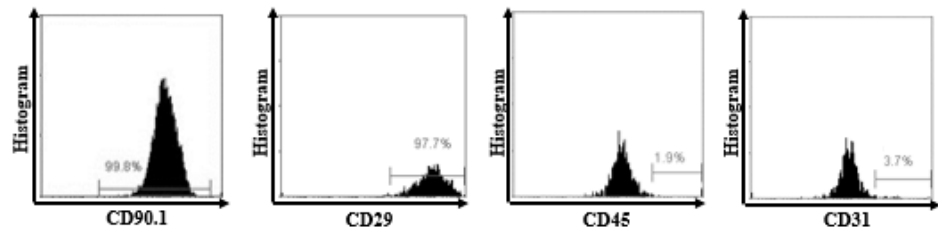
Gambar 5.2. Karakter morfologi sel hasil Isolasi. Morfologi sel hasil Isolasi memiliki karakter seperti MSC yaitu berbentuk bulat lonjong inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol (*fibroblas-like*) dengan perbesaran mikroskop 100x (a) dan perbesaran 200x (b). Scale bar: 50 μ m.



Gambar 5.3. Kemampuan differensiasi sel hasil isolasi. (a) Sel hasil Isolasi mampu mampu berdiferensiasi menjadi *osteocyte* pada pengamatan pewarnaan *Alizarin red* dan (b) berdiferensiasi menjadi *adipocyte* pada pengamatan pewarnaan *Oil Red dye* pada pembesaran 400x. *Panah kuning: menunjukkan deposisi kalsium, panah hitam: menunjukkan lipid droplet.

5.1.1.2. Surface Marker

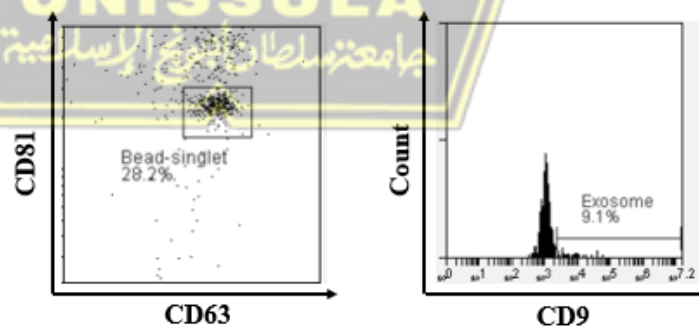
Hasil isolasi MSCs divalidasi menggunakan *Flow Cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *Surface Marker* khusus. Hasil secara kuantitatif berupa persentase ekspresi positif CD 90.1 (99,8%), CD 29 (97,7%), dan ekspresi negatif dari CD 45 (1,9%), dan CD 31 (3,7%) (**Gambar 5.5**).



Gambar 5.4. Hasil analisis flowcytometry sel hasil isolasi. Sel hasil Isolasi memiliki ekspresi CD90.1 dan CD29 yang tinggi serta ekspresi CD45 dan CD31 yang rendah.

5.1.1.3. Validasi *Exosome*

Medium MSCs yang diduga berisi *exosome* dilakukan filtrasi menggunakan teknik *Tangential Flow Filtration* (TFF), lalu persentase *Exosome* dianalisis menggunakan metode *Flow Cytometry*. Hasil analisis menunjukkan bahwa teknik filtrasi berhasil mengisolasi *Exosome* sebesar 9.1% (**Gambar 5.6**) dengan nilai MFI rata-rata 1056.35 dan nilai kadar *Exosome* rata-rata adalah 960 ng/mL.



Gambar 5.5. Hasil analisis flowcytometry Exosome-MS. Exosome MSCs membentuk populasi yang positif C81 dan CD63, serta positif CD9 sebesar 9.1%.

5.1.2. Efek Pemberian E-MSCs terhadap Ekspresi Gen p21

Penelitian *Exosome Mesencymal Stem Cell* terhadap ekspresi gen p21 dan ekspresi gen Cyclin D pada Tikus Jantan Galur Wistar yang di induksi paparan sinar UV-B telah dilakukan selama 28 hari. Hasil penelitian tersebut tertera pada (Tabel 5.1)

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada ekspresi p21 dan ekspresi Cyclin D

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 (n=6)	K2 (n=6)	K3 (n=6)	K4 (n=6)	K5 (n=6)	
Ekspresi p21						
Mean	1,03 ± 0,01	0,28 ± 0,14	0,59 ± 0,23	0,73 ± 0,15	0,91 ± 0,32	
Std.deviiasi						
<i>Shapiro Wilk</i> *	0,167	0,733	0,151	0,433	0,275	
<i>Levene test</i> ****						0,049
<i>ANOVA</i> *****						0,001*****
Ekspresi Cyclin D						
Mean	1,04 ± 0,02	0,52 ± 0,25	0,74 ± 0,24	0,78 ± 0,19	0,84 ± 0,072	
Std.deviiasi						
<i>Shapiro Wilk</i> **	0,026	0,792	0,340	0,998	0,760	
<i>Levene test</i> ****						0,007
<i>Kruskall Wallis</i> *****						0,004*****

Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Tidak Normal $p < 0,05$ ***Homogen $p > 0,05$
 ****Tidak Homogen $p < 0,05$ *****Signifikan $p < 0,05$

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi p21 terendah yaitu pada kelompok perlakuan (K2) Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9%, selanjutnya diikuti oleh kelompok perlakuan (K3) Tikus dipapar UV-B diberi perlakuan HA dosis 200uL secara *sub cutan*, selanjutnya kelompok perlakuan (K4) Tikus

dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan*, kemudian diikuti kelompok perlakuan (K5) Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan*. Rerata ekspresi p21 tertinggi adalah kelompok Tikus sehat (K1). Seluruh kelompok kadar ekspresi p21 berdasarkan uji *Shapiro Wilk* berdistribusi normal dengan nilai *p-value* >0.05 dan uji homogenitas dengan menggunakan *Lavene Test* hasilnya tidak homogen nilai *p-value* ($p < 0.05$) maka analisis data menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai *p-value* 0,001 ($p < 0.05$), kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

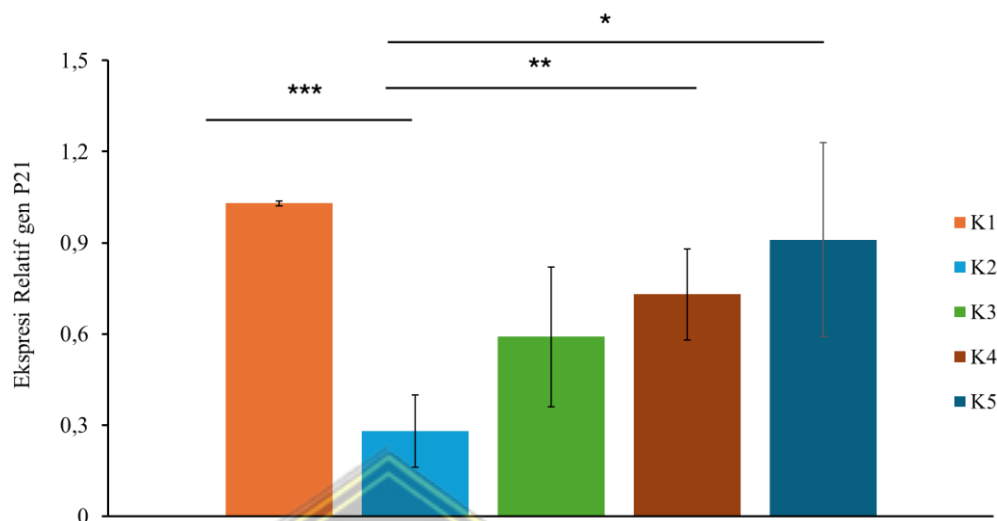
Tabel 5.2. Perbedaan Ekspresi p21 Antar 2 Kelompok

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
				Batas Bawah	Batas Atas
Ekspresi p21	K1	K2*	0,001	0,4875	1,0159
		K3*	0,050	-0,0002	0,8835
		K4*	0,037	0,0218	0,5882
		K5	0,995	-0,5016	0,7349
	K2	K3	0,190	-0,7214	0,1014
		K4*	0,003	-0,7389	-0,1544
		K5*	0,031	-1,2113	-0,587
	K3	K4	0,944	-0,5505	0,2772
		K5	0,531	-0,9126	0,2626
	K4	K5	0,927	-0,7628	0,3862

*Uji *Post Hoc Tamhane* dengan nilai signifikan $p < 0,05$

Hasil uji *Post Hoc Tamhane* pada **Tabel 5.2 dan Gambar 5.7** menunjukkan ekspresi p21 pada kelompok Tikus sehat tidak diberi perlakuan (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok

Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) nilai p-value 0.001 ($p < 0,05$), kelompok tikus sehat (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UV-B diberi perlakuan HA dosis 200uL secara *sub cutan* (K3) nilai p-value 0,050 ($p < 0,05$), dan kelompok tikus sehat (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan* (K4) nilai p-value 0,037 ($p < 0,05$). Kemudian kelompok Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan* (K4) dengan nilai p-value 0,003 ($p < 0,05$) dan kelompok Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) terdapat perbedaan signifikan pada kelompok Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan* (K5) dengan nilai p-value 0,031 ($p < 0,05$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian E-MSCs dosis 200 μ L dan 300 μ L berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi p21 pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UV-B, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.6. Ekspresi Relatif gen p21 pada jaringan kulit tikus model *collagen loss* pada semua kelompok. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5.1.3. Efek Pemberian E-MSCs terhadap Ekspresi Cyclin D

Rerata ekspresi Cyclin D terendah yaitu pada pada kelompok perlakuan (K2) Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9%, selanjutnya diikuti oleh kelompok perlakuan (K3) Tikus dipapar UV-B diberi perlakuan HA dosis 200uL secara *sub cutan*, selanjutnya kelompok perlakuan (K4) Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan*, kemudian diikuti kelompok perlakuan (K5) Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan*. Rerata ekspresi Cyclin D tertinggi adalah kelompok Tikus sehat (K1). Seluruh kelompok kadar ekspresi Cyclin D berdasarkan uji *Shapiro Wilk* berdistribusi tidak normal dengan nilai p -value < 0.05 dan uji homogenitas dengan menggunakan *Lavene Test* hasilnya tidak homogen nilai p -value ($p < 0.05$) maka analisis data menggunakan uji *Kruskall Wallis*. Hasil

uji *Kruskall Wallis* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai *p-value* 0.004 ($p < 0.05$), kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

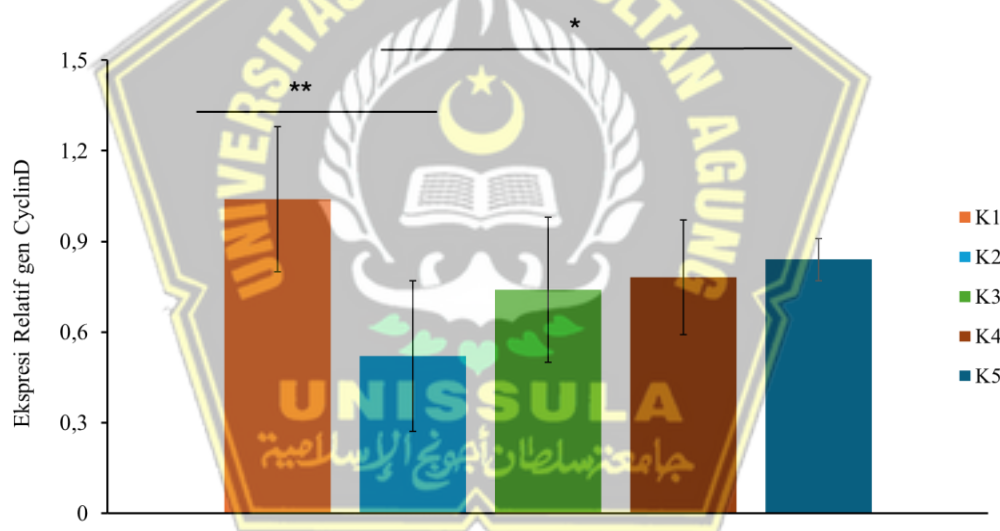
Tabel 5.3. Perbedaan Ekspresi Cyclin D Antar 2 Kelompok

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
Ekspresi Cyclin D	K1	K2*	0,002
		K3*	0,041
		K4*	0,009
		K5*	0,02
		K3	0,132
	K2	K4	0,093
		K5*	0,041
	K3	K4	0,818
		K5	0,485
	K4	K5	0,485

*Uji *Mann Whitney* dengan nilai signifikan $p < 0,05$

Hasil uji *Mann Whitney* pada **Tabel 5.3** dan **Gambar 5.7** menunjukkan ekspresi Cyclin D pada kelompok Tikus sehat tidak diberi perlakuan (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) nilai *p-value* 0,002 ($p < 0,05$), kelompok tikus sehat (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UV-B diberi perlakuan HA dosis 200uL secara *sub cutan* (K3) nilai *p-value* 0,041 ($p < 0,05$), kelompok tikus sehat (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan* (K4) dengan nilai *p-value* 0,009 ($p < 0,05$), kelompok tikus sehat (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL

secara *sub cutan* (K5) dengan nilai p-value 0,02 ($p < 0,05$) dan kelompok Tikus dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan* (K5) nilai p-value 0,041 ($p < 0,05$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian E-MSCs dosis 200 μ L dan 300 μ L berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi Cyclin D pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UV-B, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.7. Ekspresi Relatif mRNA Cyclin D pada jaringan kulit tikus model *collagen loss* pada semua kelompok. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5.2. Pembahasan

ROS yang dihasilkan oleh UV-B dapat menyebabkan kerusakan DNA, dalam hal ini juga menginduksi MMPs (*Matriks Metalo Proteinase*) yang dapat memicu degradasi *collagen* yang direspon oleh protein sensor kerusakan DNA seperti ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) dan ATR

(*ATM and Rad3-related*)¹. ATM dan ATR adalah kinase yang diaktifkan sebagai respons terhadap kerusakan DNA. Setelah diaktifkan, ATM dan ATR akan memfosforilasi berbagai target protein, termasuk p53¹. Fosforilasi p53 oleh ATM/ATR meningkatkan stabilitas dan aktifitas transkripsional p53. p53 yang teraktivasi akan menginduksi ekspresi berbagai gen target yang terlibat dalam respons terhadap kerusakan DNA. Selain itu ROS juga dapat mengaktifkan enzim I κ B kinase (IKK). IKK kemudian memfosforilasi inhibitor dari NF- κ B, yaitu I κ B. Fosforilasi I κ B mengarah pada degradasi proteasomal dari I κ B, melepaskan NF- κ B dimana dapat menginduksi MMPs (*Matriks Metallo Proteinase*) yang dapat memicu degradasi *collagen*. NF- κ B kemudian berpindah ke inti sel dan menginduksi transkripsi gen target seperti SMAD2/3 dan mengaktifkan SMAD4. Fosforilasi SMAD2/3 berikatan dengan SMAD4, membentuk kompleks heteromerik yang berpindah ke inti sel. Di dalam inti, kompleks ini berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen target. Salah satu gen target yang diinduksi oleh kompleks SMAD2/3/4 adalah p21 (CDKN1A) yaitu inhibitor siklus sel yang menghambat aktivitas cyclin-dependent kinase (CDK), yang mengontrol kemajuan siklus sel. p21 menginduksi henti siklus sel pada fase G1/S, mencegah proliferasi sel². Penurunan produksi kolagen oleh fibroblast akibat henti siklus sel yang diinduksi oleh p21 dapat menyebabkan degradasi atau penipisan matriks ekstraseluler. Disisi lain ROS yang dihasilkan oleh UVB dapat mengaktifkan jalur kinase yang diatur oleh mitogen (MAPK). Tiga jalur

utama MAPK yang terlibat adalah ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), dan p38 MAPK. Aktivasi JNK, salah satu jalur MAPK, secara khusus mengarah pada fosforilasi dan aktivasi c-Jun, yang merupakan komponen dari faktor transkripsi AP-1 (*Activator Protein-1*) dimana AP-1 dapat menginduksi MMPs (Matriks Metallo Proteinase) yang memicu degradasi *collagen*. Kompleks AP-1 yang terdiri dari c-Jun/c-Fos mengikat elemen respons AP-1 pada promotor gen target, termasuk cyclin D. Aktivasi AP-1 oleh c-Jun/c-Fos meningkatkan transkripsi cyclin D, yang pada gilirannya mempromosikan progresi siklus sel dan proliferasi sel fibroblast³.

Hasil analisis menunjukkan bahwa E-MSCs dosis 300µl mampu secara signifikan meningkatkan ekspresi gen p21. Hal ini diduga karena E-MSCs mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, IL, *Growth Factor* (GF), hormon, exosome, mikrovesikel, faktor anti inflamasi dll^{51,52}. 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 TGFβ^{53,54}. TGFβ memiliki peran kunci dalam regulator sintesis *procollagen I*⁵⁵. Lebih lanjut TGFβ menginduksi penundaan aktivasi ERK *signaling pathway*^{55,56}. Disisi lain TGFβ menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan MMP tidak aktif sehingga tidak ada degradasi *collagen*⁵⁷. Kandungan IL-10

yang tinggi pada *exosome* dapat menghambat produksi ROS sehingga menurunkan inflamasi dan aktivasi p53^{19,58}. Ketika terjadi kerusakan pada DNA, p53 akan memberikan sinyal kepada gen pengkode protein p21 sehingga p21 akan diproduksi. Protein p21 akan menghambat laju dari siklus sel, sehingga sel yang rusak tidak akan digandakan. Penghentian siklus sel juga memberikan waktu kepada DNA untuk memperbaiki diri. Setelah diperbaiki, siklus sel akan berjalan normal lagi dan menggandakan sel yang telah diperbaiki.

Hasil analisis menunjukkan bahwa E-MSCs dosis 300µl juga mampu secara signifikan meningkatkan ekspresi gen Cyclin D. Hal tersebut dikarenakan E-MSCs mengandung berbagai molekul bioaktif termasuk protein, RNA (mRNA, miRNA), lipid, dan faktor pemberi sinyal lainnya. *Exosome* yang diturunkan dari MSC dapat mengurangi produksi ROS dan kerusakan oksidatif pada berbagai jenis sel, termasuk keratinosit dan sel kulit yang terkena radiasi UV-B. Kandungan miRNA di dalam *exosome* dapat meningkatkan ekspresi gen CCND1 atau protein *Cyclin D* baik dengan meningkatkan aktivitas transkripsi atau melalui penghambatan *inhibitor Cyclin D*.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah tidak melakukan analisis *pathway* utama mengenai bagaimana E-MSCs mampu menghambat *Reactive Oxygen Species* (ROS), apakah melalui *pathway* Sirt1/PGC1a, PI3K/Akt/MAPK, atau NFκβ. Jalur biokimia yang terlibat dalam respon antioksidan dan degradasi *collagen* sangat kompleks. Penelitian ini mungkin

tidak sepenuhnya menjelaskan interaksi antara berbagai jalur dan faktor lain yang mungkin terlibat. Studi lanjutan diperlukan untuk memetakan secara lebih rinci mekanisme molekuler yang mendasari.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

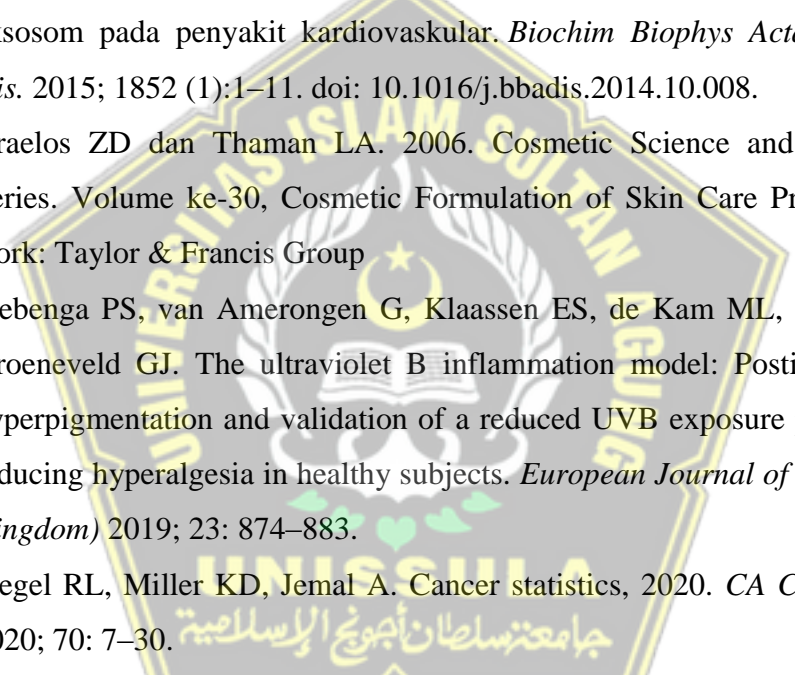
1. Terdapat peningkatan ekspresi gen p21 secara signifikan pada tikus model *colagen loss* yang dipapar sinar UV-B setelah diberi E-MSCs secara *sub cutan* dengan dosis 300µL dibandingkan kontrol secara *in vivo*.
2. Terdapat peningkatan ekspresi gen Cyclin D secara signifikan pada tikus model *colagen loss* yang dipapar sinar UV-B setelah diberi E-MSCs secara *sub cutan* dengan dosis 300µL dibandingkan kontrol secara *in vivo*.

6.2. Saran

Diharapkan studi yang akan datang dapat menganalisis *pathway* utama mengenai bagaimana E-MSCs mampu menghambat *Reactive Oxygen Species* (ROS), apakah melalui *pathway* Sirt1/PGC1a, PI3K/Akt/MAPK, atau NF-kB.

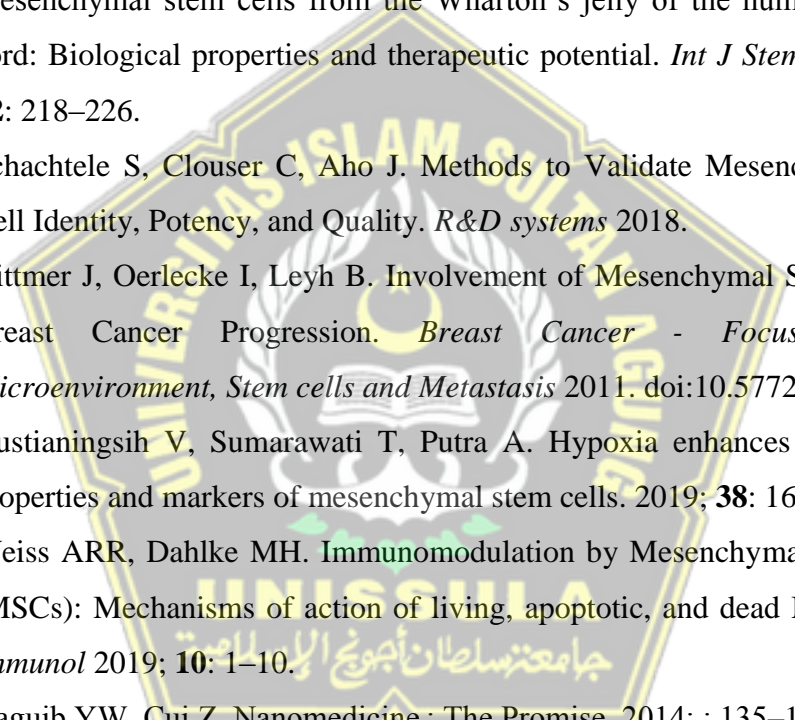
DAFTAR PUSTAKA

1. Herrling Th, Jung K, Fuchs J. *Spectrochimica Acta Bagian A: Spektroskopi Molekuler dan Biomolekuler*. 2006; 63 :840–845.
2. Davies KJA, Pryor WA. *Biologi & Pengobatan Radikal Bebas*. 2005; 39 :1263.
3. Pugliese P. *Fisiologi kulit II*. Perusahaan Penerbitan Terikat; 2001. hlm.109–137.
4. Jackson R. *Can Fam Physician*. 2001;47:1236–1243. Elderly and sun-affected skin. Distinguishing between changes caused by aging and changes caused by habitual exposure to sun
5. Fujimori E. *FEBS Lett*. 1988; 235 :98–102. Cross-linking of collagen CNBr peptides by ozone UV light
6. Sionkowska A. *Polim Deg Stab*. 2000; 68 :147–151. Modification of collagen film by ultraviolet irradiation
7. Kato Y, Uchida K, Kawakishi S. *Photochem Photobiol* . 1994; 59 :343–349. Aggregation of collagen expose to UVA in the presence of riboflavin : a plausible role of tyrosine modification
8. Miles CA, Sionkowska A, Hulin SL, Sims TJ, Avery NC, Bailey AJ. *J Biol Kimia*. 2000; 275 (42):33014–33020.
9. Narita M, Narita M, Krizhanovsky V, Nunez S, Chicas A, Hearn SA, Myers MP, Lowe SW (2006) Peran baru untuk protein kelompok mobilitas tinggi dalam penuaan seluler dan pembentukan heterokromatin. *Sel* 126 : 503–514
10. Collado M, Blasco MA, Serrano M (2007) Penuaan seluler pada kanker dan penuaan. *Sel* 130 : 223–233
11. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T , Capper D, Pritchard C, Inman GJ *et al* (2013) Program sekretori kompleks yang diatur oleh inflammasome mengontrol penuaan parakrin. *Nat Cell Biol* 15 : 978–990

12. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW (2008) Penuaan sel stellate yang diaktifkan membatasi fibrosis hati. *Sel* 134 : 657–667
13. Xue W, Meylan E, Oliver TG, Feldser DM, Winslow MM, Bronson R, Jacks T (2011) Respon dan resistensi terhadap inhibitor NF-kappaB pada model tikus adenokarsinoma paru. *Penemuan Kanker* 1 : 236–247
14. Lasorella A, Benezra R, Iavarone A (2014) Protein ID: pengatur utama sel induk kanker dan agresivitas tumor. *Nat Rev Cancer* 14 : 77–91
15. Ailawadi S, Wang X, Gu H, Fan GC. Fungsi patologis dan potensi terapeutik eksosom pada penyakit kardiovaskular. *Biochim Biophys Acta Mol dasar Dis.* 2015; 1852 (1):1–11. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.10.008.
16. Draelos ZD dan Thaman LA. 2006. Cosmetic Science and Technology Series. Volume ke-30, Cosmetic Formulation of Skin Care Products. New York: Taylor & Francis Group
17. Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain (United Kingdom)* 2019; 23: 874–883.
18. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; 70: 7–30. 
19. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2015. doi:10.1111/phpp.12145..
20. 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.
21. 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.

22. 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.
23. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Berbagai fungsi p21 dalam siklus sel, apoptosis dan regulasi transkripsi setelah kerusakan DNA. *Perbaikan DNA*. 2016; 42 :63–71. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008.
24. Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, dkk. Pensinyalan kerusakan DNA memicu degradasi histone methyltransferases melalui APC/C(Cdh1) dalam sel tua. *Sel Mol*. 2012; 45 (1):123–131. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.018..
25. Bailly S, Fay M, Israël N, Gougerot-Pocidalo MA. Faktor transkripsi AP-1 berikatan dengan promotor alfa interleukin 1 manusia. *Jaringan Sitokin Eur*. 1996; 7 (2):125–128.
26. Poljšak B, Dahmane R. Radikal bebas dan penuaan kulit ekstrinsik. *Praktek Dermatol Res*. 2012; 2012 :135206. doi: 10.1155/2012/135206.
27. Zhang Y, Pan Y, Liu Y, Li X, Tang L, Duan M *et al*. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor- β receptor inhibition. *Stem Cell Res Ther* 2021; 12. doi:10.1186/s13287-021-02517-0.
28. Hu S, Li Z, Cores J, Huang K, Su T, Dinh PU *et al*. Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging. *ACS Nano* 2019; 13: 11273–11282.
29. You Y, Tian Y, Yang Z, Shi J, Kwak KJ, Tong Y *et al*. Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy. *Nat Biomed Eng* 2023; 7: 887–900.
30. Li J, Li Z, Wang S, Bi J, Huo R. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit production of extracellular matrix in keloid fibroblasts via downregulating transforming growth factor- β 2 and Notch-1 expression. *Bioengineered* 2022; 13: 8515–8525.
31. Tutuianu R, Rosca AM, Iacomi DM, Simionescu M, Titorencu I. Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote in vitro wound healing

- by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis. *Int J Mol Sci* 2021; 22. doi:10.3390/ijms22126239.
32. Mandal M, Bandyopadhyay D, Goepfert TM, Kumar R. Interferon menginduksi ekspresi inhibitor kinase dependen siklin p21^{WAF1} dan p27^{Kip1} yang mencegah aktivasi kinase dependen siklin oleh CDK-activating kinase (CAK) *Oncogene*. 1998; 16 :217–225.
 33. Smits VA, dkk. p21 menghambat fosforilasi Thr161 dari Cdc2 untuk menegakkan pos pemeriksaan kerusakan DNA G2. *J Biol Kimia*. 2000; 275 :30638–30643.
 34. Abbas T, Jha S, Sherman NE, Dutta A. Fosforilasi autokatalitik CDK2 pada pengaktifan Thr160. *Siklus sel*. 2007; 6 :843–852.
 35. Nat Rev Cancer. Author manuscript; available in PMC 2010 Jun 1. *Published in final edited form as: Nat Rev Cancer*. 2009 Jun; 9(6): 400–414. doi: 10.1038/nrc2657
 36. O'Reilly MA. Aktivasi redoks p21^{Cip1/WAF1/Sdi1} : pengatur multifungsi kelangsungan hidup dan kematian sel. *Sinyal Redoks Antioksidasi*. 2005; 7 :108–118.
 37. Nat Rev Cancer. Author manuscript; available in PMC 2010 Jun 1. *Published in final edited form as: Nat Rev Cancer*. 2009 Jun; 9(6): 400–414. doi: 10.1038/nrc2657
 38. PDB: 2W96; Day PJ, Cleasby A, Tickle IJ, O'Reilly M, Coyle JE, Holding FP, et al. (March 2009). "Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type cyclin". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106** (11): 4166–70. Bibcode:2009PNAS..106.4166D. doi:10.1073/pnas.0809645106. PMC 2657441. PMID 19237565.
 39. "cyclin D - Protein". NCBI.
 40. *Titik Pembatasan Siklus Sel". Cyclins: Dari Sinyal Mitogen ke Titik Pembatasan. Austin (TX): Biosains Landes. 2013.*

41. Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, dkk. (Oktober 1995). "Mengubah mutan p21ras dan c-Ets-2 mengaktifkan promotor cyclin D1 melalui wilayah yang dapat dibedakan". *Jurnal Kimia Biologi*. **270**(40):23589–97. doi: 10.1074/jbc.270.40.23589. PMID7559524.
42. Mol Cell. Author manuscript; available in PMC 2019 Oct 18. *Published in final edited form as:* Mol Cell. 2019 May 16; 74(4): 758–770.e4. Published online 2019 Apr 11. doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.020
43. 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.
44. Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems* 2018.
45. Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis* 2011. doi:10.5772/21325.
46. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. 2019; **38**: 164–171.
47. 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. 
48. Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014; : 135–156.
49. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep* 2016; **2**: 168–173.
50. 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.
51. 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.

52. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 552.
53. 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.
54. Kevin Range and DMYAM. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* 2012; **23**: 1–7.
55. 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. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; **116**: 351–358.
56. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004; **36**: 1482–1491.
57. 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. *Journal of Biological Chemistry* 2013; **288**: 8737–8749.
58. 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.
59. Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
60. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958.

61. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; **2**: 5–10.
62. Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol Clin* 2010; **28**: 93–105.
63. Edwards QA, Lunat I, Neale LDG, Kulikov SM. Water-Organic Solvent Media. 2015; **13**: 1218–1226.
64. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SEG, Kang S, Fisher GJ *et al.* Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *American Journal of Pathology* 2006; **168**: 1861–1868.
65. Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 6098–6107.
66. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC *et al.* Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research* 2012; **32**: 428–438.
67. Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM. Hijacking of the AP-1 signaling pathway during development of ATL. *Front Microbiol* 2018; **8**: 1–13.
68. Fernandez F. BIOSYNTHESIS OF COLLAGEN Biochemical and Physicochemical Characterization of Collagen-Synthesizing Polyribosomes Preparation of the Ribosomal Suspension. *J Cell Biol* 1967; **33**: 27–42.
69. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1341–1353.
70. Omari S, Makareeva E, Gorrell L, Jarnik M, Lippincott-Schwartz J, Leikin S. Mechanisms of procollagen and HSP47 sorting during ER-to-Golgi trafficking. *Matrix Biol* 2020; : 1–16.

71. Xi Q. *Razumikhin-type theorems for impulsive differential equations with piecewise constant argument of generalized type*. 2018 doi:10.1186/s13662-018-1725-5.
72. Ishikawa Y, Bächinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2013; **1833**: 2479–2491.
73. Al-Qattan MM, Abd-Elwahed MM, Hawary K, Arafah MM, Shier MK. Myofibroblast expression in skin wounds is enhanced by collagen III suppression. *Biomed Res Int* 2015; **2015**. doi:10.1155/2015/958695.
74. Fan Y, Jeong JH, You GY, Park JU, Choi TH, Kim S. An Experimental Model Design for Photoaging. *Journal of Craniofacial Surgery* 2015. doi:10.1097/SCS.0000000000001902.
76. Shi T, Dansen TB. Reactive Oxygen Species Induced p53 Activation: DNA Damage, Redox Signaling, or Both? *Antioxidants Redox Signal* 2020; **33**: 839–859.
77. Romanov V, Pospelov V, (Moscow) TP-B, 2012 undefined. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21Waf1: Contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Springer* 2012; **77**: 575–584.
78. D'Angelo S, Martino E, Ilisso CP, Bagarolo ML, Porcelli M, Cacciapuoti G. Pro-oxidant and pro-apoptotic activity of polyphenol extract from Annurca apple and its underlying mechanisms in human breast cancer cells. *Int J Oncol* 2017; **51**: 939–948.