

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI *PROTEIN KINASE A (PKA)* DAN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (VEGFR)* MENCIT MODEL HIPERPIGMENTASI
(Studi Eksperimental *In Vivo* Mencit C75bl/6 Model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UV-B)**

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S2



Disusun Oleh:

Sheila Jessica Andavania

MBK 2321010375

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

2024

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI *PROTEIN KINASE A (PKA)* DAN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (VEGFR)* MENCIT MODEL HIPERPIGMENTASI
(Studi Eksperimental *In Vivo* Mencit C75bl/6 Model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UV-B)**

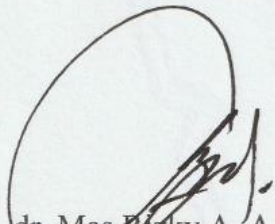
Disusun oleh :

Sheila Jessica Andavania

MBK 2321010375

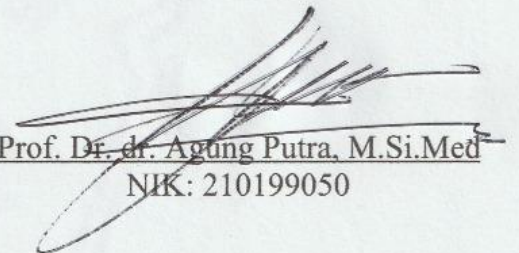
Telah disetujui oleh :

Pembimbing I



dr. Mas Rizky A. A. Syamsunarno, M.Kes., Ph.D
NIDN: 0001128204

Pembimbing II



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

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



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

PERNYATAAN

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

Semarang, 23 Oktober 2024
Yang menyatakan,



(Sheila Jessica)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

1. Nama : Sheila Jessica Andavania
2. Tempat, tanggal lahir : Bogor, 2 November 1991
3. Agama : Katolik
4. Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SD : Lulus tahun 2004
2. SMP : Lulus tahun 2007
3. SMA : Lulus tahun 2010
4. FK Universitas : Lulus tahun 2015
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2023— sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. RS Siloam Bogor : 2018 - 2019
2. Diva Clinic Bogor : 2020 - 2021
3. Diva'S Beauty Clinic Bogor : 2021- sekarang

D. Riwayat Keluarga

- Ayah : drg. Antonio Soesinto Adiprasetyo
Ibu : drg. Lindawati, MKM
Suami : dr. Osmond Stefan
Anak : Rafael Alvaro Stefan

KATA PENGANTAR



Bersyukur kepada Allah SWT atas segala anugerah-Nya, penulis berhasil menyelesaikan tesis berjudul: "**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI *PROTEIN KINASE A (PKA)* DAN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (VEGFR)* MENCIT MODEL HIPERPIGMENTASI (Studi Eksperimental *In Vivo* Mencit C75bl/6 Model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UV-B)." Tesis ini untuk memenuhi persyaratan gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.**

Penulis mengakui bahwa tesis ini dapat diselesaikan tidak terlepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada semua yang telah memberikan kontribusi, baik secara langsung maupun tidak langsung, dalam penyelesaian tesis ini. Penulis khususnya ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum, Rektor Universitas Islam Sultan Agung, dan para wakil rektor atas kesempatan untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B.FINACS, Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4. dr. Mas Rizky A. A. Syamsunarno, M.Kes., Ph.D sebagai pembimbing I dan Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med sebagai pembimbing II, yang telah meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang memberikan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan proposal tesis
6. Seluruh staff Stem Cell and Cancer Research yang mendampingi dan memberikan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan proposal tesis

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penelitian ini. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik membangun dari siapa pun. Semoga penelitian ini bermanfaat bagi banyak pihak. Aamiin ya rabbal alamin.

Semarang, 6 Agustus 2024

(Sheila Jessica Andavania)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
ABSTRAK.....	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Hiperpigmentasi	10
2.1.1. Definisi.....	10
2.1.2. Proses Hiperpigmentasi.....	10
2.2. PKA (<i>Protein Kinase A</i>).....	14
2.2.1. Definisi.....	14
2.2.2. Fungsi PKA.....	15

2.2.3.	Mekanisme PKA	16
2.3.	VEGFR	19
2.3.1.	Definisi	19
2.3.2.	Mekanisme	20
2.4.	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSCs)	21
2.4.1.	Definisi	21
2.4.2.	Karakteristik MSCs	22
2.4.3.	Hipoksia	23
2.4.4.	Exosome	24
2.4.5.	Hubungan antar variabel Pengaruh <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i> terhadap PKA dan VEGFR model mencit hiperpigmentasi	27
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....		29
3.1.	Kerangka Teori	29
3.2.	Kerangka Konsep	34
3.3.	Hipotesis	34
BAB IV METODE PENELITIAN		35
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	35
4.2.	Variabel dan Definisi Operasional	36
4.2.1.	Variabel Penelitian	36
4.2.2.	Definisi Operasional	36
4.3.	Populasi dan Sampel Penelitian	37
4.3.1.	Populasi Penelitian	37
4.3.2.	Sampel Penelitian	38
4.4.	Alat dan Bahan Penelitian	39
4.4.1.	Alat Penelitian	39
4.4.2.	Bahan Penelitian	40
4.5.	Cara Penelitian	40
4.5.1.	Cara Perolehan <i>Etichal Clearance</i>	40
4.5.2.	Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cells (MSCs)</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	41

4.5.3.	Proses <i>Hypoxia</i>	42
4.5.4.	Pembacaan CD90, CD29, CD45, CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i>	42
4.5.5.	Pembuatan <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stemcell</i>	44
4.5.6.	Pemaparan Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Penelitian.....	44
4.5.7.	Setelah pemaparan UVB selama 2 minggu, mencit kontrol negative diberikan Nacl 300 ml , mencit kontrol positif diberikan retinol 0,1% dalam 200µl minyak zaitun , mencit perlakuan diberikan injeksi exosome 1x di hari ke-15 dengan dosis 200 µl dan 300 µl/kgBB.	45
4.5.8.	Terminasi dan Pengambilan Jaringan	45
4.5.9.	Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA.....	45
4.5.10.	Prosedur Pembuatan Preparat dan Pembacaan Hiperpigmentasi	47
4.5.11.	Prosedur Pembacaan Ekspresi PKA dan VEGFR dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	48
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian	49
4.6.1.	Tempat Penelitian.....	49
4.6.2.	Waktu Penelitian	49
4.7.	Analisis Data	49
4.8.	Alur Penelitian.....	50
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		51
5.1.	Hasil Penelitian.....	51
5.1.1.	Hasil Validasi MSCs	51
5.1.2.	Hasil Validasi Exosome	53
5.1.3.	Hasil Validasi Hiperpigmentasi	55
5.1.4.	Ekspresi PKA dan VEGFR	56
5.2.	Pembahasan Hasil Penelitian.....	60
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		66
6.1.	Kesimpulan.....	66

6.2. Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA.....	67
LAMPIRAN.....	76



DAFTAR SINGKATAN

α -MSH	: <i>Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone</i>
AA	: <i>Atraric Acid</i>
AKAP	: <i>A-Kinase Anchoring Proteins</i>
alfaSMA+	: <i>Alpha Smooth Muscle Actin Positive</i>
APC	: <i>Allophycocyanin</i>
ASC	: <i>Adipose-Derived Stem Cells</i>
ATM	: <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	: <i>ATM- and Rad3-related</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
BCL 2	: <i>B-cell Lymphoma 2</i>
CD29	: <i>Cluster of Differentiation 29</i>
CD31	: <i>Cluster of Differentiation 31</i>
CD44	: <i>Cluster of Differentiation 44</i>
CD45	: <i>Cluster of Differentiation 45</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
c-Fos	: <i>Cellular Proto-Oncogene Fos</i>
c-Jun	: <i>Cellular Proto-Oncogene Jun</i>
CM	: <i>Conditioned Media</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
DEPC	: <i>Diethyl Pyrocarbonate</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DOPA	: <i>Dihydroxyphenylalanine</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
HIF1	: <i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i>

HUVECs	: <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IGF	: <i>Insulin-Like Growth Factor</i>
ICAM-1	: <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IDO	: <i>Indoleamine 2,3-Dioxygenase</i>
IKK β	: <i>IκB Kinase Beta</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
LAMP1, LAMP2	: <i>Lysosome-Associated Membrane Protein 1, 2</i>
lncRNA	: <i>Long Non-Coding RNA</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MAPKK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
MAPKKK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MEK	: <i>MAPK/ERK Kinase</i>
MFI	: <i>Mean Fluorescence Intensity</i>
miRNA	: <i>MicroRNA</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MTP 2	: <i>Metallothionein Protein 2</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NRP-1	: <i>Neuropilin-1</i>
OCT 4	: <i>Octamer-Binding Transcription Factor 4</i>
OspF	: <i>Outer Shigella Protein F</i>
PBS	: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PE	: <i>Phycoerythrin</i>
perCP-cyTM5.5	: <i>Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex-cyanine dye 5.5</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
POMC	: <i>Pro-Opiomelanocortin</i>
qRT-PCR	: <i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
REX 1	: <i>Reduced Expression Protein 1</i>

RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RNAase	: <i>Ribonuclease</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RQ	: <i>Relative Quantification</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SDF 1	: <i>Stromal Cell-Derived Factor 1</i>
SNARE	: <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-Related Protein 1</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-Related Protein 2</i>
TYR	: <i>Tyrosinase</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
YopJ	: <i>Yersinia Outer Protein J</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 4.1. Reagen yang Digunakan dalam <i>Flow Cytometry</i>	43
Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Kadar PKA dan VEGFR (dari data deskriptif	57
Tabel 5.2. <i>Uji Post Hoc LSD PKA</i>	58
Tabel 5.3. <i>Uji Post Hoc Tamhane VEGFR</i>	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Sinar UV dapat menginduksi ROS	11
Gambar 2.2.	ROS mempengaruhi kompleks MAPK dan NFkB	12
Gambar 2.3.	Paparan UV mempengaruhi ROS memasuki jalur NFkB dan MAPK.....	14
Gambar 2.4.	Fosforilasi PKA dengan AKAP.....	15
Gambar 2.5.	Aktivasi PKA mempengaruhi VEGFR	19
Gambar 2.6.	Pengaruh PKA terhadap VEGF.....	21
Gambar 2.7.	<i>Mesenchymal Stem Cell (MSCs)</i>	22
Gambar 2.8.	Karakteristik MSCs sebagai imunomodulator.....	23
Gambar 2.9.	Hypoxia MSCs	24
Gambar 2.10.	Exosome MSCs	25
Gambar 2.11.	Fungsi <i>Exosome Hypoxia MSCs</i>	27
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	33
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	34
Gambar 4.1.	Rancangan Penelitian	35
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	50
Gambar 5.1.	Morfologi MSCs dan Analisis flow cytometry	52
Gambar 5.2.	Grafik Flowcitometry	54
Gambar 5.3.	Grafik Marker permukaan <i>Exosome MSCs</i>	55
Gambar 5.4.	Gambar Validasi Hiperpigmentasi.	55
Gambar 5.5.	Grafik Kadar PKA.....	59
Gambar 5.6.	Grafik Kadar VEGFR.....	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Penelitian	76
Lampiran 2. Hasil Analisis.....	77
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian	79
Lampiran 4. <i>Ethical Clearance</i>	80



ABSTRAK

Latar Belakang : Hiperpigmentasi adalah kondisi kulit yang disebabkan oleh peningkatan produksi melanin, paling banyak disebabkan karena paparan sinar UVB yang mengaktifkan jalur MAPK/ERK dan meningkatkan ekspresi PKA dan VEGFR, yang berperan dalam proses melanogenesis. Terapi hiperpigmentasi saat ini memiliki keterbatasan, termasuk efek samping dan risiko kesehatan. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stemcell* menunjukkan potensi dalam menurunkan aktivitas PKA dan VEGFR. Penelitian ini menguji efek *exosome* terhadap aktivitas PKA dan VEGFR, sebagai alternatif terapi yang minim risiko efek samping. Tujuan : untuk melihat pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stemcell* terhadap ekspresi PKA dan VEGFR pada mencit hiperpigmentasi.

Metode : Penelitian experimental in vivo menggunakan subjek 30 ekor mencit C57bl/6 yang dibagi menjadi 5 kelompok, yang diberi paparan sinar UV selama 2 minggu, seminggu 3x selama 9 menit, setelah hari ke 7 perlakuan dengan *Exosome* dilakukan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Hasil : Penelitian ini mengkaji pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (MSCs)* terhadap ekspresi *Protein Kinase A (PKA)* dan *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)* pada model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UV-B pada mencit C57BL/6. Mencit dibagi menjadi lima kelompok, termasuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang menerima injeksi *exosome* sebanyak 200 μ L dan 300 μ L. Uji One Way ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan pada ekspresi PKA dan VEGFR antar kelompok ($p < 0,05$). Analisis Post Hoc menunjukkan bahwa injeksi retinol dan *exosome* menurunkan ekspresi PKA dan VEGFR, dengan dosis *exosome* yang lebih tinggi menghasilkan penurunan yang lebih besar. Temuan ini menunjukkan bahwa *exosome* berpotensi menjadi terapi untuk hiperpigmentasi.

Kesimpulan : Pemberian *Exosome-MSCs* dengan dosis 200 μ L dan 300 μ L terbukti menurunkan kadar PKA dan VEGFR secara signifikan pada mencit dengan hiperpigmentasi dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata kunci : PKA, VEGFR, *Exosome*, Hiperpigmentasi

ABSTRACT

Background: Hyperpigmentation is a skin condition caused by increased melanin production, primarily triggered by UVB exposure that activates the MAPK/ERK pathway and increases the expression of PKA and VEGFR, both of which play roles in melanogenesis. Current treatments for hyperpigmentation have limitations, including side effects and health risks. Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (MSC)-derived exosomes have shown potential in reducing PKA and VEGFR activity. This study aims to investigate the effects of these exosomes on PKA and VEGFR activity as a low-risk therapeutic alternative.

Objective: To determine the effect of Hypoxia MSC-derived exosomes on PKA and VEGFR expression in a mouse model of hyperpigmentation.

Methods: This in vivo experimental study used 30 C57BL/6 mice divided into five groups, exposed to UV radiation for 2 weeks, 3 times per week for 9 minutes each session. From day 7, treatments with exosomes were administered, and PKA and VEGFR expression levels were measured using Polymerase Chain Reaction (PCR).

Results: This study examined the effect of Hypoxia MSC-derived exosomes on PKA and VEGFR expression in UV-B-induced hyperpigmentation in C57BL/6 mice. Mice were divided into control and treatment groups, with the latter receiving exosome injections of 200 μ L and 300 μ L. One-way ANOVA revealed significant differences in PKA and VEGFR expression between groups ($p < 0.05$). Post Hoc analysis showed that both retinol and exosome injections reduced PKA and VEGFR expression, with higher exosome doses achieving greater reductions. These findings indicate that exosomes have potential as a therapeutic option for hyperpigmentation.

Conclusion: Administration of MSC-derived exosomes at doses of 200 μ L and 300 μ L significantly reduced PKA and VEGFR levels in hyperpigmented mice compared to controls.

Keywords : PKA, VEGFR, Exosome , Hyperpigmentation

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperpigmentasi adalah kondisi kulit di mana terjadi peningkatan produksi melanin, sehingga menyebabkan area kulit menjadi lebih gelap dibandingkan dengan kulit di sekitarnya. Terapi hiperpigmentasi saat ini seperti *Hydroquinon*, *Retinol*, *Oral therapy*, *chemical peeling*, dan *Laser Therapy* dapat efektif dalam menangani kasus hiperpigmentasi. Namun memiliki efek samping yang perlu diperhatikan seperti penggunaan *chemical peeling* berisiko menyebabkan inflamasi, dan bekas luka. Pengobatan oral, dapat menyebabkan iritasi kulit spesifik, sensasi terbakar, dan eritema. Terapi laser pada beberapa kasus menimbulkan *post inflammatory hyperpigmentation*. Sedangkan penggunaan agen topikal seperti hidrokuinon, meskipun efektif, terbatas oleh *larangan Food and Drug Administration* karena *potensi karsinogenik*, *menunjukkan risiko kesehatan yang serius*¹.

Hiperpigmentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti sinar matahari, genetik, obat-obatan dan sebagainya. Salah satu penyebab yang paling sering ialah sinar matahari yaitu UVB^{2,3,4}. Paparan UVB dapat menginduksi stres oksidatif yaitu ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang dapat memicu berbagai jalur sinyal dalam sel-sel kulit^{2,3,4,5,6}. Pada penelitian sebelumnya, beberapa jalur UV terhadap hiperpigmentasi yaitu jalur MAPK, jalur NFKB dan jalur P53^{7,8,9}.

Salah satu jalur sinyal yang terlibat yang berhubungan dengan penelitian ini adalah UVB merangsang ROS dan masuk ke jalur MAPK/ERK yang dapat mempengaruhi peningkatan ekspresi PKA, yang dapat mempengaruhi berbagai aspek biologis dalam melanosit, termasuk regulasi proliferasi sel, aktivitas tirosinase, dan produksi melanin^{9, 10,11}. VEGFR dapat diaktifkan oleh paparan UVB, melalui jalur PKA. PKA memfosforilasi protein tertentu yang berfungsi sebagai faktor transkripsi atau regulator transkripsi. Faktor-faktor ini kemudian meningkatkan ekspresi gen VEGFR^{12,13,14}. Untuk itu, terjadi peningkatan transkripsi dan sintesis protein VEGFR, lebih banyak reseptor ini tersedia di permukaan sel, membuat sel-sel tersebut lebih responsif terhadap sinyal VEGF. Aktivasi VEGFR dapat mempengaruhi melanogenesis, proses produksi melanin oleh melanosit^{13,14}. Maka perlu diteliti efek *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap PKA dan VEGFR.

Pada penelitian sebelumnya, ditemukan kasus hiperpigmentasi yang rentan didapatkan oleh ras Asia. Prevalensi tinggi pada usia reproduktif, dengan tipe kulit Fitzpatrick III-V dan orang-orang yang tinggal di daerah dengan paparan sinar matahari yang tinggi. Di Indonesia, diperkirakan sekitar 0,25-4% dari semua kasus penyakit kulit^{15,16}.

Aktivitas MAPK dan VEGFR diketahui dapat dipengaruhi oleh *exosome* dalam penelitian sebelumnya^{17,18}. *Exosome* merupakan nanovesikel ekstraseluler berukuran 100-500 kDa (50-150 nm) yang dilepaskan oleh sel, dan telah banyak dieksplorasi untuk potensinya dalam bidang kosmetik,

perawatan kulit, regenerasi jaringan, serta penyakit dermatologis^{19,20}. Nilai terapeutik exosome terletak pada kemampuannya untuk mengatur microenviromental, mengontrol ekspresi gen, dan merangsang diferensiasi sel, yang berdampak positif pada kesehatan kulit²¹. Dalam bidang estetika, digunakan untuk mengurangi kerutan, meningkatkan tekstur dan hidrasi kulit, serta memperbaiki elastisitas kulit, mengurangi peradangan dan kerusakan akibat radiasi UV²².

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan penurunan aktivitas PKA dan VEGFR dalam kasus hiperpigmentasi dengan exosome, untuk mengatasi hiperpigmentasi dengan lebih efektif, terapi yang minim efek samping dibandingkan dengan terapi-terapi hiperpigmentasi yang sudah pernah ada sebelumnya.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah: "Apakah terdapat pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi PKA dan VEGFR pada mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB?"

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh *Exosome Hypoxia MSCs* terhadap ekspresi VEGFR dan PKA pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan penurunan ekspresi PKA pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB dan pemberian *Exosome Hypoxia MSCs* kelompok perlakuan pada dosis 200µl dan 300 µl dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Untuk membuktikan penurunan ekspresi VEGFR pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB dan pemberian *Exosome Hypoxia MSCs* kelompok perlakuan pada dosis 200 µl dan 300 µl dibandingkan dengan kelompok kontrol.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh *Exosome Hypoxia MSCs* dalam dunia kedokteran sebagai agen regeneratif yang berpengaruh terhadap regenerasi/ perbaikan kulit akibat paparan sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat mengungkapkan peran *Exosome Hypoxia MSCs* dalam regenerasi/ perbaikan kulit dan pencegah hiperpigmentasi yang efektif. Selain itu penelitian ini dapat memberikan sumber informasi pada masyarakat mengenai pengaruh

Exosome Hypoxia MSCs terhadap perbaikan/regenerasi kulit.

Penelitian lebih lanjut dapat di aplikasikan bagi masyarakat.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Peneliti,Tahun	Judul	Metode	Hasil
Bochenek I W, 2023	Evaluation of the Reduction of Skin Hyperpigmentation Changes under the Influence of a Preparation Containing Kojic Acid Using Hyperspectral Imaging—Preliminary Study ²³ .	In vivo, eksperimental	Studi dengan kamera hiperspektral menunjukkan asam kojic meningkatkan kecerahan kulit pada 75% pasien, mengurangi kontras pada 83%, dan meningkatkan homogenitas pada 67% pasien.
Wei Zhu,Jian. 2020	Tranexamic Acid Inhibits Angiogenesis and Melanogenesis in Vitro by Targeting VEGF Receptors ²⁴ .	In vitro, eksperimental	Penelitian menunjukkan asam traneksamat (TA) menghambat pertumbuhan HUVEC dan melanosit tanpa merusak sel. TA menurunkan ekspresi dan aktivasi VEGFR yang dipicu VEGF165, menghambat proliferasi, migrasi, dan pembentukan pembuluh darah pada HUVEC, serta menurunkan aktivitas tirosinase dan produksi melanin pada melanosit. TA berpotensi mencegah pembentukan pembuluh darah dan melanin melalui penghambatan sinyal VEGFR, berguna untuk pengobatan melasma.

Li, Jing. 2022	Atraric Acid Ameliorates Hyperpigmentation through the Downregulation of the PKA/CREB/MITF Signaling Pathway ²⁵ .	In vitro dan in vivo. Eksperimen	Penelitian ini menunjukkan atraric acid (AA) mengurangi hiperpigmentasi yang diinduksi α -MSH pada sel PIG1 dan UVB pada guinea pig tanpa efek sitotoksik pada 250 μ M. AA lebih efektif dibanding arbutin dalam menurunkan melanin dan aktivitas tirosinase. Mekanisme AA melibatkan penghambatan PKA/CREB/MITF dan ekspresi MC1R, serta fosforilasi, dengan dosis 3% efektif mengurangi hiperpigmentasi tanpa efek samping pada hati dan ginjal.
Wei Ju,Zhian. 2019	Activation of VEGF receptors in response to UVB promotes cell proliferation and melanogenesis of normal human melanocytes ¹⁴ .	In vitro, eksperimental	Penelitian ini menunjukkan VEGF165 dan UVB meningkatkan ekspresi VEGFR-1, VEGFR-2, dan NRP-1 di melanosit, serta memicu stres oksidatif dan hipoksia. Aktivasi VEGFRs meningkatkan ekspresi protein melanogenik, proliferasi sel, aktivitas tirosinase, dan produksi melanin. Netralisasi VEGFR-2 terutama mengurangi efek ini. Tranexamic acid (TA) menurunkan tirosinase dan melanin dengan menghambat aktivasi VEGFRs dan ekspresi protein melanogenik.

Seung Cho, Byong. 2020	Skin Brightening Efficacy of Exosomes Derived from Human Adipose Tissue-Derived Stem/Stromal Cells: A Prospective, Split-Face, Randomized Placebo-Controlled Study ²⁶ .	In vitro,eksperi mental	Studi ini mengisolasi eksosom ASC dari sel punca adiposa berukuran 138.0 ± 1.9 nm dengan marker CD9, CD63, dan CD81. Eksosom tidak toksik terhadap sel melanoma B16F10 hingga 3.0×10^{11} partikel/mL dan mengurangi produksi melanin, baik tanpa atau dengan α -MSH. Uji klinis pada 21 wanita menunjukkan penurunan signifikan melanin setelah 8 minggu, terutama pada wanita di bawah 50 tahun, tanpa efek samping.
Yu Wang, Xiao.2021	Human amniotic stem cells-derived exosomal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively ²⁷ .	In vitro dan in vivo eksperimental	hASCs dan CM secara signifikan mengurangi hiperpigmentasi yang diinduksi α -MSH dan UVB pada sel B16F10, tikus, dan kulit manusia dengan menekan sintesis melanin dan memicu degradasi melanosom. MiR-181a-5p dan miR-199a dari eksosom hASCs menghambat melanogenesis dengan menekan MITF. Temuan ini mendukung potensi hASCs dan eksosom sebagai terapi non-seluler untuk gangguan hiperpigmentasi.
Kim, Hee Song. 2023	Interruption of p38MAPK-MSK1-CREB-MITF-M pathway to prevent	In Vivo. eksperimental	BI2B topikal mengurangi hiperpigmentasi akibat UV-B dengan

hyperpigmentation in the skin ²⁸ .	menghambat tirosinase, MITF-M, POMC, dan jalur MKK3-p38MAPK, serta mengurangi transfer melanosom. BI2B berpotensi mencegah gangguan pigmentasi kulit.
---	---

Ulasan hasil penelitian diatas. Penelitian -penelitian sebelumnya ada beberapa tatalaksana untuk mengatasi mekanisme hiperpigmentasi serta pengembangan agen terapeutik baru yang lebih efektif dan aman. Penelitian mencakup berbagai senyawa aktif, teknologi modern, serta pendekatan molekuler yang inovatif. Beberapa penelitian sebelumnya mempengaruhi jalur ROS, MAPK/PKA yang mempengaruhi aktivitas VEGFR. Sementara itu, asam traneksamat (TA) telah terbukti tidak hanya menghambat melanogenesis tetapi juga angiogenesis melalui penghambatan sinyal VEGFR. Dengan menurunkan ekspresi dan aktivasi VEGFR, aktivitas *tyrosinase* dapat menekan produksi melanin, dan proliferasi melanosit. Pendekatan multitarget ini memberikan wawasan baru bahwa angiogenesis dan hiperpigmentasi saling terkait melalui jalur VEGFR, yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan hiperpigmentasi.

Di sisi lain, *atraric acid* (AA) dapat menghambat jalur PKA/CREB/MITF. Penelitian ini memperkuat relevansi jalur PKA dalam regulasi melanogenesis dan perannya sebagai target terapeutik. Penelitian sebelumnya didapatkan *exosome* yang berasal dari sel punca adiposa (*adipose-derived stem cells* atau ASC) menjadi terobosan menarik dalam

terapi hiperpigmentasi. *Exosome*, dengan miRNA seperti miR-181a-5p dan miR-199a, menghambat melanogenesis melalui penekanan ekspresi MITF. *Exosome* juga memengaruhi jalur MAPK, PKA, dan VEGFR, yang semuanya berperan penting dalam regulasi pigmentasi. Jalur MAPK dikenal memicu proliferasi melanosit dan produksi protein melanogenik, sedangkan jalur PKA/CREB/MITF merupakan jalur utama dalam aktivasi tirosinase. Dengan menekan aktivasi VEGFR, *exosome* dapat menekan VEGF165 yang bersifat meningkatkan stres oksidatif, hipoksia, dan melanogenesis. Studi klinis menunjukkan *Exosome* ASC dapat secara signifikan mengurangi melanin dalam 8 minggu tanpa efek samping, terutama pada wanita di bawah 50 tahun.

Secara keseluruhan, penelitian ini menyoroti pendekatan baru dalam terapi hiperpigmentasi, mempengaruhi sinyal MAPK, PKA dan VEGFR sebagai target utama. Temuan-temuan ini memberikan landasan kuat untuk pengembangan agen terapeutik inovatif, yang tidak hanya efektif tetapi juga aman dalam jangka panjang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hiperpigmentasi

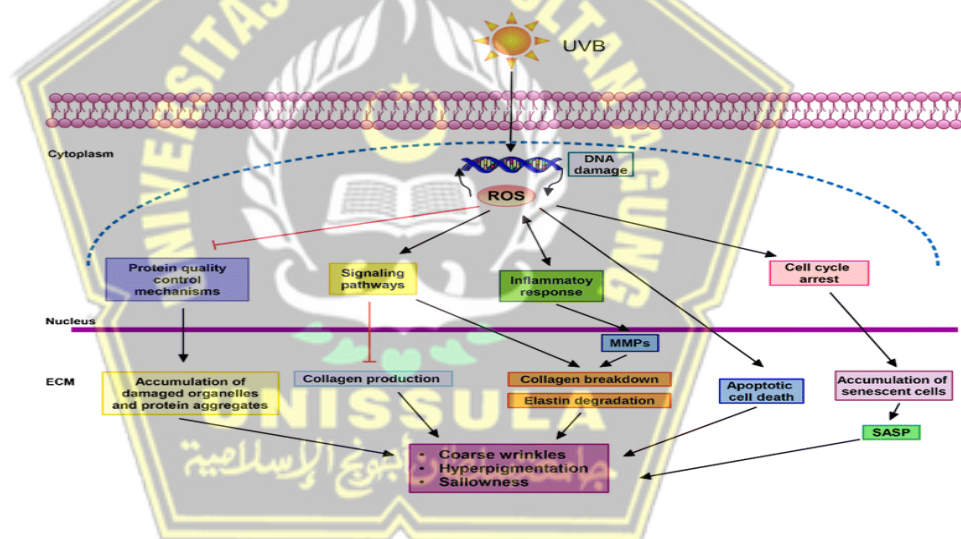
2.1.1. Definisi

Hiperpigmentasi kulit adalah kondisi dermatologis umum di mana warna kulit menjadi lebih gelap akibat berbagai faktor internal dan eksternal, seperti perubahan hormonal, peradangan, jerawat, eksim, obat-obatan tertentu, dan paparan sinar UV. Warna dan pigmentasi kulit diatur oleh proses biologis yang melibatkan produksi melanin, pigmen kulit yang dihasilkan oleh melanosit di berbagai lapisan kulit. Perubahan dalam produksi atau distribusi melanin oleh melanosit dapat menyebabkan gangguan hiperpigmentasi, yang membuat kulit tampak lebih gelap^{1,28}.

2.1.2. Proses Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi akan terjadi apabila kulit terpapar sinar UVB secara berulang dalam kurun waktu tertentu²⁹. Hiperpigmentasi disebabkan oleh paparan sinar UVB dan melibatkan beberapa jalur molekuler yang saling terkait. Jalur-jalur utama yang berperan dalam proses ini mencakup jalur MAPK, jalur protein p53, dan jalur NF- κ B. Masing-masing jalur ini memiliki mekanisme spesifik yang mempengaruhi produksi melanin, yang pada akhirnya menyebabkan hiperpigmentasi^{28,30,31}.

Ketika kulit terpapar sinar UVB, terjadi pembentukan DAMPs yang meningkat, setelah itu terjadi peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS), yaitu molekul oksigen reaktif yang dapat menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan sel. Kemudian mengaktifasi TLR-4 yang merupakan reseptor yang dapat mengenali DAMPs. ROS ini berfungsi sebagai sinyal yang mengaktifkan jalur *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK), sebuah keluarga protein kinase yang mengatur berbagai fungsi seluler, termasuk proliferasi, diferensiasi, dan respons terhadap stres^{7,32}.

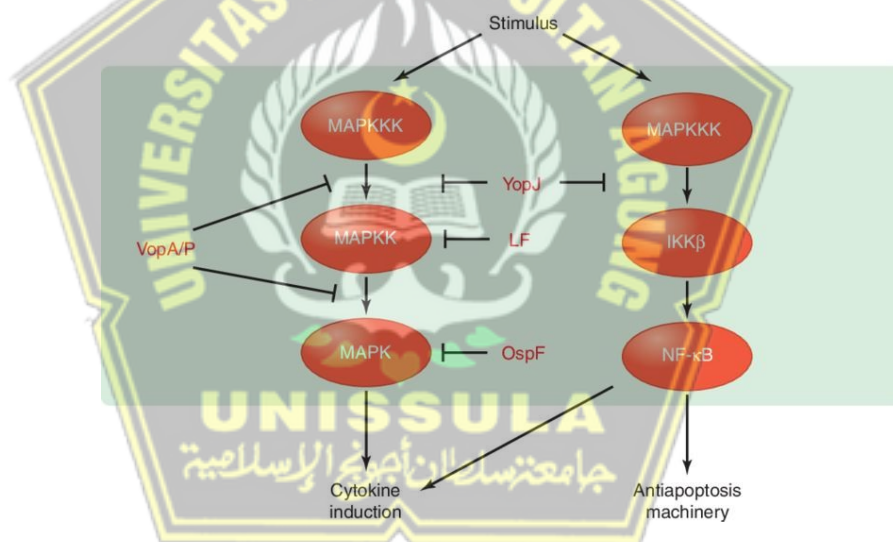


Gambar 2.1. Sinar UV dapat menginduksi ROS yang mengakibatkan berbagai proses jalur sinyal seperti mempengaruhi penurunan kolagen, respon inflamasi, dan hiperpigmentasi³².

MAPK terdiri dari tiga subkeluarga utama: ERK (*Extracellular signal-regulated Kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), dan p38 MAPK. UVB menyebabkan peningkatan ROS yang mengaktifkan ERK. ERK kemudian mengaktifasi *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), faktor transkripsi utama

dalam melanogenesis. MITF meningkatkan ekspresi gen-gen yang mengkode enzim tirosinase, TRP-1, dan TRP-2, yang semuanya esensial dalam produksi melanin^{7,33}.

Selain ERK, p38 MAPK juga diaktifkan oleh ROS. Aktivasi p38 MAPK meningkatkan ekspresi MITF, yang dapat meningkatkan aktivitas enzim tirosinase dan memicu produksi melanin lebih banyak. JNK, meskipun kontribusinya terhadap hiperpigmentasi tidak sebesar ERK dan p38 MAPK, juga dapat berinteraksi dengan MITF dan meningkatkan aktivitasnya^{9,33}.

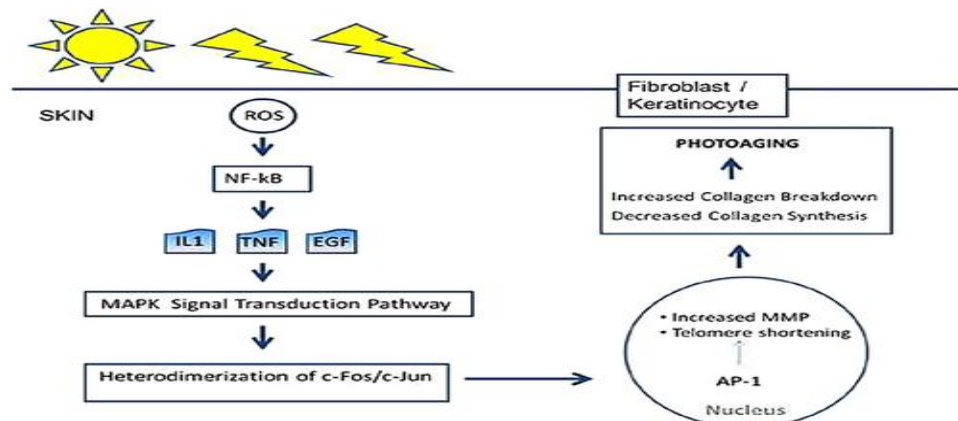


Gambar 2.2. ROS mempengaruhi kompleks MAPK dan NFKb³⁴.

Paparan sinar UVB juga menyebabkan kerusakan DNA yang memicu aktivasi protein p53. Aktivasi p53 terjadi melalui fosforilasi oleh kinases seperti ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) dan ATR (*ATM- and Rad3-related*). Aktivasi p53 meningkatkan ekspresi *pro-opiomelanocortin* (POMC), yang kemudian diproses menjadi *alpha-melanocyte-stimulating hormone* (α -MSH). α -MSH berikatan

dengan *melanocortin 1 receptor* (MC1R) pada permukaan melanosit, mengaktifkan jalur cAMP-PKA yang meningkatkan ekspresi MITF dan tirosinase, yang pada akhirnya menyebabkan peningkatan produksi melanin⁸.

Selain itu, paparan sinar UVB juga mengaktifkan jalur NF- κ B melalui pembentukan ROS dan kerusakan DNA. NF- κ B adalah kompleks protein yang berfungsi sebagai faktor transkripsi penting dalam respons inflamasi dan stres seluler. Aktivasi NF- κ B meningkatkan ekspresi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1, dan IL-6. Sitokin-sitokin ini dapat mempengaruhi melanosit secara langsung atau melalui mediator lain, yang meningkatkan produksi melanin. NF- κ B juga berinteraksi dengan jalur MAPK dan p53, memperkuat sinyal yang mengarah pada peningkatan produksi melanin. Selain itu, NF- κ B meningkatkan ekspresi molekul adhesi seperti ICAM-1 yang mempengaruhi interaksi antara keratinosit dan melanosit, mempercepat transfer melanin^{35,36,37}.



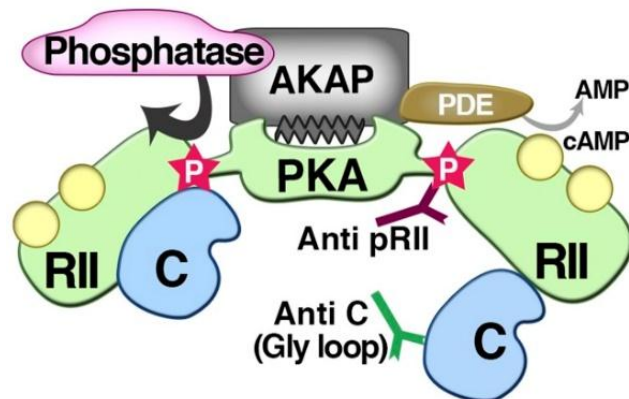
Gambar 2.3. Paparan UV mempengaruhi ROS memasuki jalur NFkB mempengaruhi IL 1, TNF dan EGF yang pada akhirnya mempengaruhi kompleks MAPK terjadi proses photoaging³⁷.

2.2. PKA (*Protein Kinase A*)

2.2.1. Definisi

Protein kinase A (PKA), enzim penting yang terlibat dalam berbagai proses seluler, termasuk metabolisme, transkripsi gen, dan siklus sel.

PKA adalah holoenzim yang terdiri dari dua subunit regulator (R) dan dua subunit katalitik (C). Dalam kondisi tidak aktif, subunit regulator dan katalitik membentuk kompleks heterotetramerik (R₂C₂), di mana subunit katalitik terikat oleh subunit regulator, sehingga menghalangi aktivitas katalitik. Aktivasi PKA dapat dimediasi oleh berbagai cara yaitu signal MAPK/ERK melalui AKAP dan dapat juga melalui CAMP yang merupakan sebuah molekul *messenger* kedua yang diproduksi sebagai respons terhadap berbagai sinyal ekstraseluler, seperti hormon dan neurotransmitter^{10,11,12}.



Gambar 2.4. Fosforilasi PKA (*Protein Kinase A*) dengan AKAP / *Scaffold Protein*. PKA memiliki dua subunit regulatorik dan satu subunit katalitik¹⁰.

2.2.2. Fungsi PKA

PKA dapat mengatur berbagai proses biologis melalui fosforilasi protein target. Beberapa fungsi utama PKA meliputi:

1. Mengatur jalur metabolik seperti glikogenolisis (pemecahan glikogen) dan lipolisis (pemecahan lemak) dengan memfosforilasi enzim yang terlibat dalam proses ini^{10,11,12}.
2. Mempengaruhi ekspresi gen dengan memfosforilasi faktor transkripsi seperti CREB (*cAMP response element-binding protein*), yang kemudian mengikat elemen respons cAMP pada DNA dan mengaktifkan transkripsi gen target^{39,40}.
3. Memodulasi fungsi sinaptik dan plastisitas sinaptik dengan memfosforilasi protein yang terlibat dalam transmisi sinaptik dan pembentukan memori.
4. Dalam kasus Hiperpigmentasi, PKA dapat mengaktifkan transkripsi gen melanogenik, peningkatan enzim melanogenesis,

stimulasi diferensiasi dan proliferasi melanosit, peningkatan transport melanin

Aktivitas PKA diatur ketat oleh beberapa mekanisme, termasuk:

5. Tingkat cAMP yang mengatur aktivitas PKA sangat dipengaruhi oleh enzim *adenylyl cyclase* (yang menghasilkan cAMP) dan *fosfodiesterase* (yang memecah cAMP)⁴⁰.
6. PKA dapat diangkut ke lokasi spesifik dalam sel melalui protein *A-kinase anchoring proteins* (AKAPs), yang memastikan fosforilasi yang tepat dari substrat target di lokasi yang diperlukan^{38,41}.

2.2.3. Mekanisme PKA

Jalur MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) dapat mempengaruhi aktivitas PKA (*Protein Kinase A*) tanpa melalui cAMP, dapat melalui interaksi dengan protein AKAP (*A-Kinase Anchoring Proteins*). Mekanisme ini kompleks dan melibatkan berbagai interaksi molekuler yang memastikan regulasi tepat dari produksi melanin, yang kemudian berkontribusi pada hiperpigmentasi⁴².

Ketika faktor eksternal seperti sinar UV atau hormon mengaktifkan reseptor di permukaan sel melanosit, jalur pensinyalan MAPK diaktifkan. Aktivasi ini dimulai dengan aktivasi protein Ras, yang memicu kaskade sinyal dengan mengaktifkan Raf, yang kemudian mengaktifkan MEK (*MAPK/ERK kinase*), dan akhirnya

mengaktifkan ERK (*extracellular signal-regulated kinase*). ERK yang aktif kemudian dapat masuk ke dalam nukleus atau berinteraksi dengan berbagai protein lain di sitoplasma untuk melanjutkan sinyalnya⁴³.

AKAP berfungsi sebagai jangkar untuk PKA, menempatkannya di lokasi spesifik dalam sel dan memungkinkan interaksi dengan protein target tertentu. Dalam konteks interaksi dengan jalur MAPK, AKAP memainkan peran kunci dalam memfasilitasi komunikasi antara PKA dan komponen lain dari jalur pensinyalan. Ketika ERK diaktifkan dalam jalur MAPK, ERK dapat memfosforilasi AKAP atau protein lain yang berinteraksi dengan PKA. Fosforilasi ini menyebabkan perubahan konformasi atau aktivitas AKAP, yang pada gilirannya dapat memodifikasi interaksi PKA dengan subunit regulatornya^{45,46}.

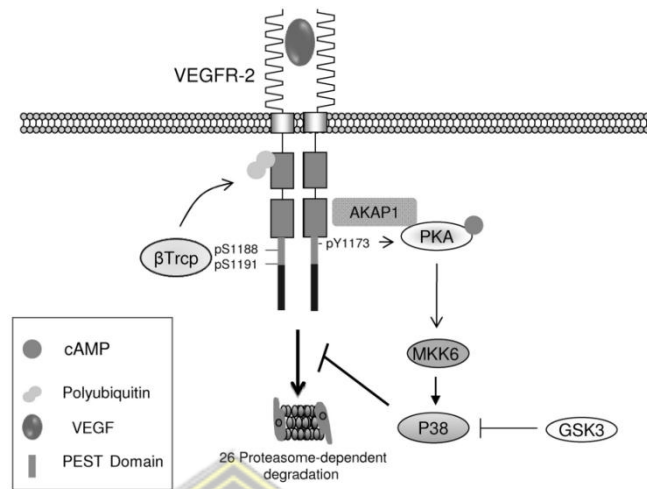
Modifikasi ini dapat mengaktifkan PKA tanpa memerlukan peningkatan konsentrasi cAMP. Salah satu cara ini dapat terjadi adalah melalui perubahan konformasi AKAP yang meningkatkan pengikatan PKA ke protein target tertentu atau memfasilitasi pelepasan subunit katalitik PKA dari subunit regulatornya. Aktivasi PKA kemudian memungkinkan fosforilasi langsung dari berbagai protein target di sitoplasma dan nukleus⁴⁷.

Salah satu target utama dari PKA yang diaktifkan adalah CREB (*cAMP response element-binding protein*). Meskipun

biasanya diaktifkan oleh PKA melalui jalur cAMP, dalam konteks ini, PKA yang diaktifkan melalui jalur MAPK juga dapat memfosforilasi CREB. Fosforilasi CREB mengaktifkannya sebagai faktor transkripsi, memungkinkan CREB mengikat elemen respons cAMP pada DNA dan meningkatkan transkripsi gen MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*)⁴⁸.

MITF adalah faktor transkripsi utama yang mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam produksi melanin, seperti tirosinase, TRP-1, dan TRP-2. Peningkatan ekspresi MITF mengarah pada peningkatan sintesis dan aktivitas enzim-enzim ini, yang berperan dalam biosintesis melanin. Tirosinase, misalnya, mengkatalisis konversi tirosin menjadi DOPA dan kemudian menjadi dopaquinone, yang merupakan langkah awal dalam produksi melanin. TRP-1 dan TRP-2 memproduksi melanin^{48,49}.

PKA juga dapat menstabilkan aktivitas VEGFR dengan memfosforilasi residu tertentu pada VEGFR atau protein adaptor yang berinteraksi dengan VEGFR, mencegah degradasi VEGFR, sehingga memperpanjang durasi dan kekuatan sinyal¹⁴. Dalam konteks melanogenesis, atau produksi melanin, aktivasi VEGFR yang diperkuat oleh PKA memicu peningkatan aktivitas jalur MAPK/ERK serta jalur pensinyalan lainnya yang berkontribusi pada peningkatan produksi melanin.



Gambar 2.5. Aktivasi PKA oleh VEGFR-2 membutuhkan asosiasi PKA dengan VEGFR-2 yang dimediasi oleh AKAP1. Aktivasi PKA besfosforilasi dengan p38MAPK, yang kemudian menghambat penurunan regulasi VEGFR-2⁵⁰.

2.3. VEGFR

2.3.1. Definisi

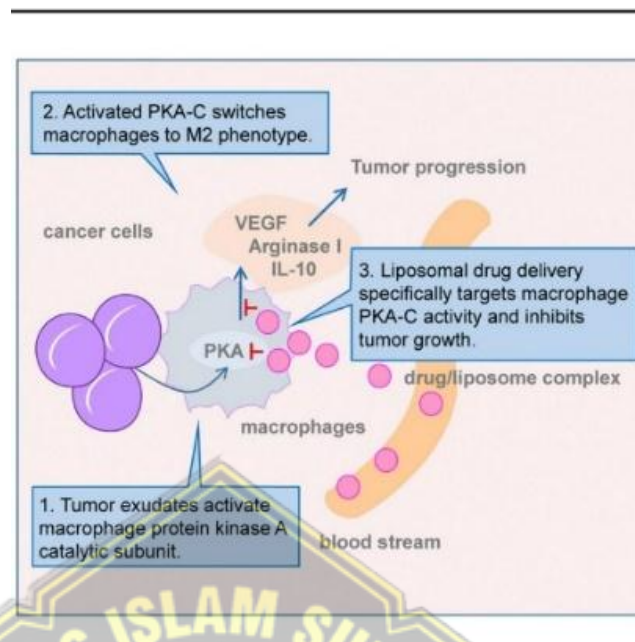
VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) adalah kelompok reseptor yang memiliki afinitas tinggi terhadap faktor pertumbuhan endotel pembuluh darah (VEGF) dan berperan penting dalam regulasi proses angiogenesis, sebagai pembentukan pembuluh darah. VEGFR juga terlibat dalam proses biologis selain angiogenesis, seperti proliferasi sel dan melanogenesis. VEGFR-2 memiliki peran yang lebih kuat sebagai reseptor VEGF, karena menunjukkan aktivasi tirosin kinase yang lebih kuat dan berperan utama dalam regulasi angiogenesis. Namun, VEGFR-1 juga memiliki peran yang signifikan dalam berbagai proses biologis, meskipun dengan aktivasi yang kurang kuat dibandingkan dengan VEGFR-2. Aktivasi VEGFR oleh VEGF, baik dalam respons

terhadap sinar UVB atau dalam kondisi normal, memicu serangkaian jalur sinyal internal yang mengatur berbagai proses biologis, termasuk proliferasi sel, regulasi ekspresi gen melanogenik, dan aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam melanogenesis^{13,14}.

2.3.2. Mekanisme

Jalur sinyal VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) memainkan peran penting. Paparan sinar UVB memicu aktivasi VEGFR-1, VEGFR-2, pada melanosit kulit manusia. VEGF, yang dihasilkan oleh keratinosit sebagai respons terhadap kerusakan UV, berinteraksi dengan VEGFRs di permukaan melanosit, memicu serangkaian jalur sinyal internal yang mengatur proses-proses biologis yang berkontribusi pada hiperpigmentasi. Aktivasi VEGFR meningkatkan ekspresi gen-gen seperti *MITF* (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*), yang mengatur ekspresi gen-gen melanogenik seperti *tyrosinase*, TRP-1, dan TRP-2. Selain itu, VEGFR juga mempengaruhi proliferasi sel melanosit secara langsung^{13,14}.

Interaksi antara VEGFR dengan faktor-faktor eksternal, seperti sitokin-sitokin yang dihasilkan oleh keratinosit atau molekul-molekul lainnya, juga memperkuat respons melanosit terhadap stimuli pigmentasi seperti paparan UV^{13,14}.



Gambar 2.6. Pengaruh PKA terhadap VEGF¹².

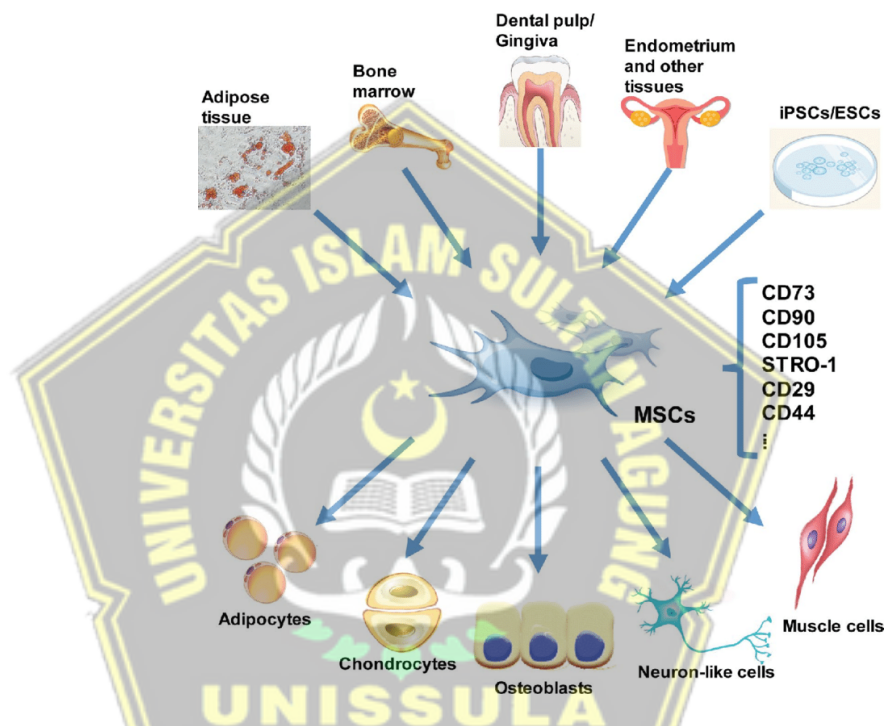
2.4. *Mesenchymal Stem Cell* (MSCs)

2.4.1. Definisi

Mesenchymal Stem Cell (MSCs) merupakan jenis sel yang memiliki kemampuan multipotensi, yang dapat berubah menjadi berbagai jenis sel dewasa lainnya, seperti sel osteosit, adiposit, dan neurosit. MSCs dapat ditemukan dan diisolasi dari berbagai sumber jaringan dalam tubuh manusia, yaitu jaringan adiposa, folikel rambut, dan Wharton Jelly yang terdapat dalam tali pusat bayi. Karakteristik umum dari MSCs adalah kemampuannya untuk menempel pada permukaan plastik dan memiliki bentuk yang mirip dengan sel fibroblast atau jarum^{27,51}.

Secara fenotipik, MSCs yang diisolasi dari mencit memiliki beberapa perbedaan dengan MSCs dari sumber lain. MSCs dari mencit, misalnya, tidak mengekspresikan marker spesifik seperti

CD44 dan CD29, tetapi mengekspresikan marker lain seperti CD45 dan CD31. Meskipun memiliki perbedaan dalam marker yang diekspresikan, MSCs menciit tetap memiliki sifat osteogenik, yang berarti memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel tulang⁵².



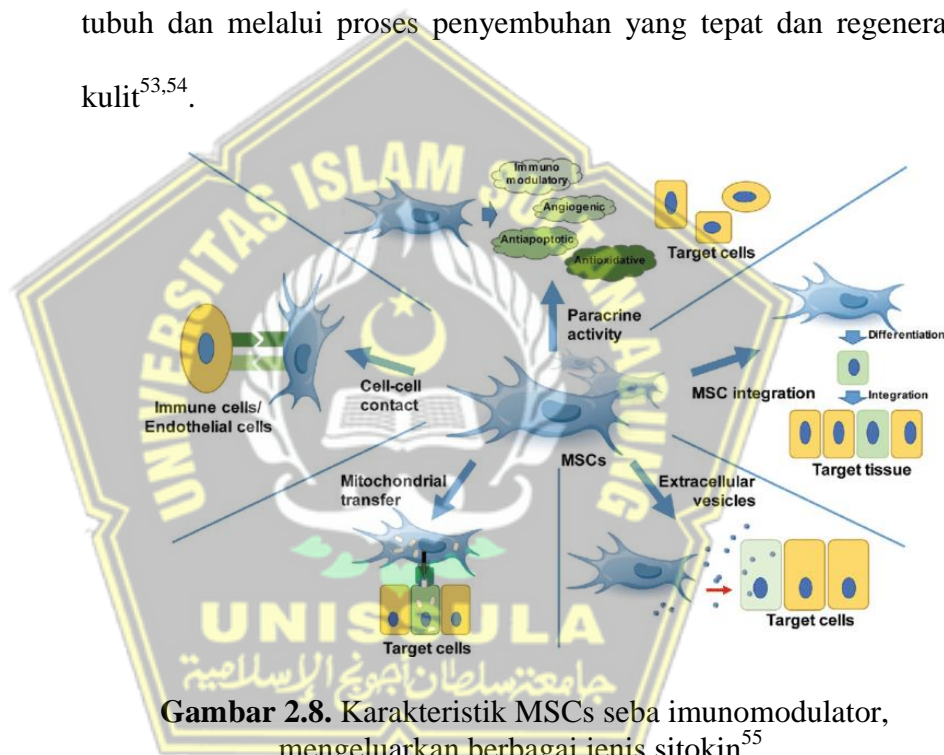
Gambar 2.7. *Mesenchymal Stem Cell (MSCs)* dapat berubah menjadi sel osteosit, adiposit, dan neurosit. Dan diisolasi dari berbagai sumber jaringan dalam tubuh manusia, termasuk jaringan adiposa, folikel rambut, dan Wharton Jelly yang terdapat dalam tali pusat²⁷.

2.4.2. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik yang sangat baik dalam regenerasi jaringan. Salah satunya adalah kemampuan self-renewal, di mana sel-sel ini mampu memperbanyak diri secara mandiri. Selain itu, MSCs juga memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa, seperti osteoblas

(sel pembentuk tulang), adiposit (sel lemak), kondrosit (sel kartilago), tenosit (sel tendon), dan miosit (sel otot)⁵³.

Tidak hanya itu, MSCs juga dikenal sebagai imunomodulator karena mampu mengeluarkan berbagai jenis sitokin, baik yang bersifat pro-inflamasi maupun anti-inflamasi. Kemampuan ini memberikan MSCs peran penting dalam mengatur respons imun tubuh dan melalui proses penyembuhan yang tepat dan regenerasi kulit^{53,54}.

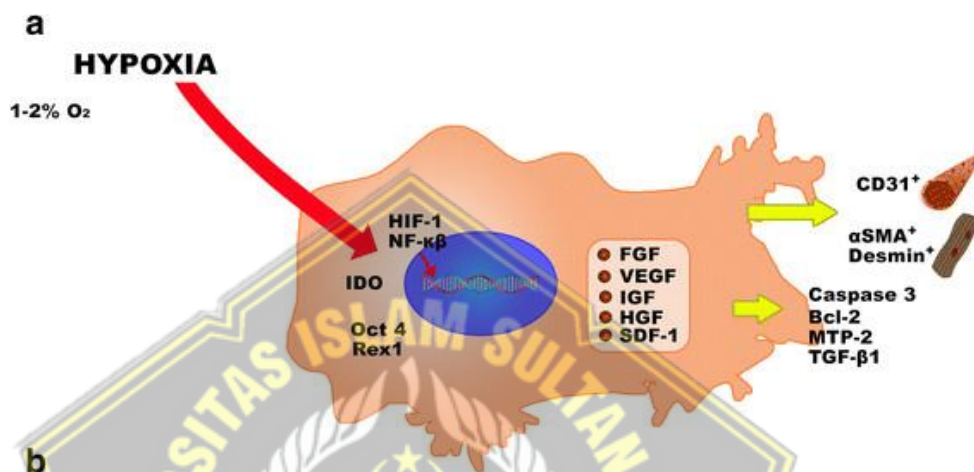


Gambar 2.8. Karakteristik MSCs sebagai imunomodulator, mengeluarkan berbagai jenis sitokin⁵⁵.

2.4.3. Hipoksia

Hipoksia adalah ketika jaringan tidak mendapatkan cukup oksigen, yang dapat merusak berbagai jenis sel. Dalam jangka panjang, kondisi ini dapat menyebabkan kematian sel. Namun, beberapa penelitian menunjukkan bahwa hipoksia bisa meningkatkan kemampuan sel-sel induk mesenkimal (MSCs) untuk

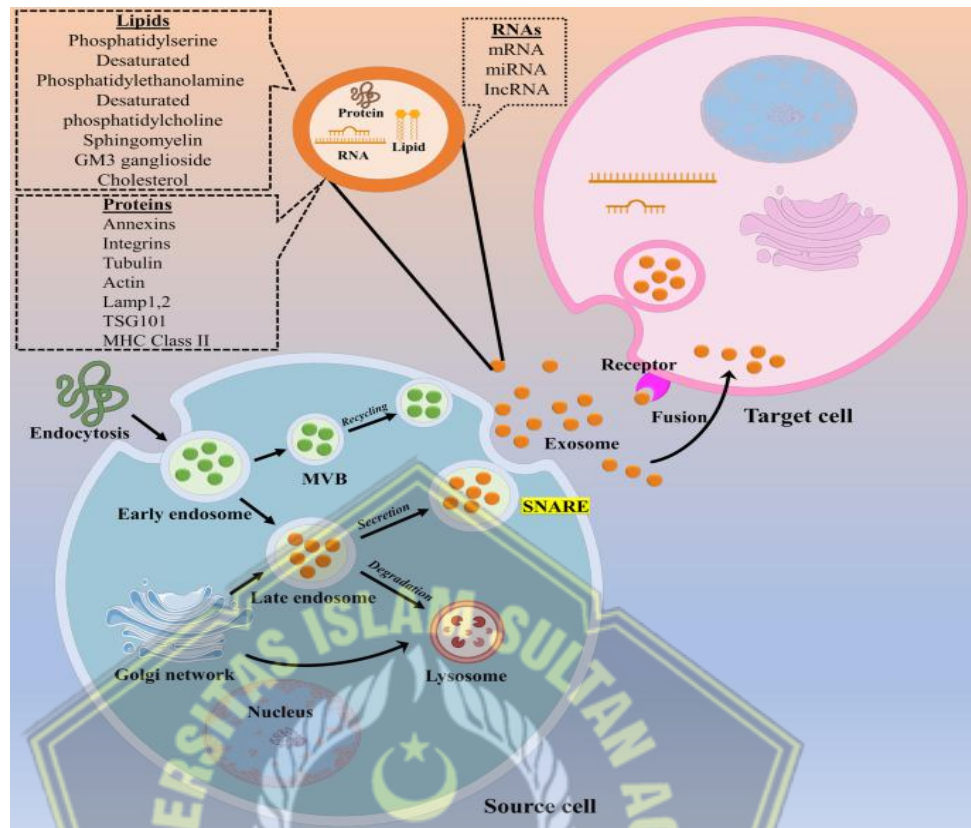
berkembang biak, memperbarui diri, dan melekat pada jaringan. Selain itu, hipoksia juga merangsang produksi Hipoksia Induksi Faktor (HIF), yang memainkan peran penting dalam meningkatkan produksi sitokin-sitokin oleh MSCs⁵⁶.



Gambar 2.9. Hypoxia MSCs⁵⁶.

2.4.4. Exosome

Exosome Hypoxia MSC (Hypoxic Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes) adalah vesikel kecil yang dilepaskan oleh sel punca mesenkimal (MSC) ke dalam lingkungan sekitarnya. Exosome ini berukuran sekitar 50-150 nanometer dan berfungsi sebagai mediator komunikasi antar sel, mengandung berbagai macam molekul bioaktif, seperti protein, lipid, RNA, dan microRNA, yang dapat mempengaruhi fungsi sel target⁵⁶.



Gambar 2.10. *Exosome HMSCs* sebagai transportasi antar sel, mengandung protein, lipid dan RNA⁵⁷.

Exosome HMSCs memiliki kemampuan dalam proses regenerasi dan peremajaan kulit, yang mengandung berbagai molekul bioaktif yang dapat berproliferasi dan berdiferensiasi, mempercepat proses regenerasi sel-sel kulit yang rusak atau mati. Sehingga membuat kulit tampak lebih muda, sehat, dan bercahaya.

Salah satu manfaat dari *exosome MSC* adalah dapat meningkatkan produksi kolagen di kulit. Dengan merangsang fibroblas kulit untuk memproduksi lebih banyak kolagen, *exosome hypoxia MSCs* membantu mengatasi anti penuaan dengan

mengurangi kerutan dan garis halus, memperbaiki tekstur kulit, dan membuat kulit tampak lebih kencang.

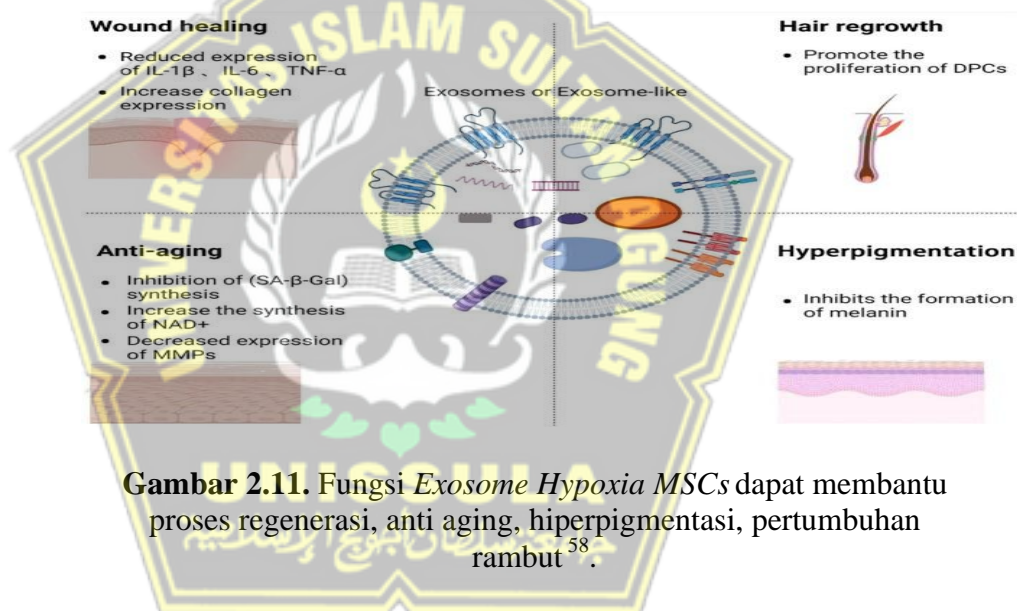
Selain itu, *exosome hypoxia MSCs* memiliki sifat anti-inflamasi yang dapat mengurangi peradangan pada kulit, dapat mengatasi berbagai kondisi kulit seperti jerawat, rosacea, dan dermatitis. Efek antioksidan dari *exosome hypoxia MSCs* juga melindungi kulit dari kerusakan akibat radikal bebas dan stres oksidatif, faktor-faktor utama yang menyebabkan penuaan kulit⁵⁷.

Pada kondisi hiperpigmentasi, *exosome hypoxia MSCs* dapat mengatur aktivitas melanosit, sel penghasil melanin, sehingga menurunkan produksi melanin yang berlebihan dan membantu meratakan warna kulit.

Dapat mempercepat pembaruan sel kulit, menggantikan sel kulit yang hiperpigmentasi dengan sel kulit baru yang sehat, sehingga bercak gelap perlahan memudar. Kemampuan mengurangi peradangan juga membantu mencegah eksaserbasi hiperpigmentasi, terutama yang disebabkan oleh peradangan kronis.

Selain itu, dengan meningkatkan penyembuhan luka dan mengurangi pembentukan jaringan parut, *exosome hypoxia MSCs* juga dapat membantu mengurangi hiperpigmentasi pasca-inflamasi, memberikan efek pencerahan pada kulit dan membuat tampak lebih cerah dan merata^{57,58}.

Exosome hypoxia MSCs banyak digunakan dalam formulasi serum dan krim perawatan kulit, serta dalam terapi profesional seperti *microneedling* atau injeksi yang mengantarkan langsung ke lapisan kulit yang lebih dalam. Dengan sifat regeneratif, anti-inflamasi, dan kemampuan untuk mengatur produksi melanin, *exosome hypoxia MSCs* mengalami peningkatan dalam kesehatan dan penampilan kulit, termasuk dalam mengatasi masalah hiperpigmentasi^{57,58,59}.



2.4.5. Hubungan antar variabel Pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap PKA dan VEGFR model mencit hiperpigmentasi

Exosome Hypoxia Mesenchymal Stemcell mengandung berbagai faktor bioaktif, termasuk miRNA dan protein, yang dapat memengaruhi jalur sinyal spesifik di sel target.

PKA (Protein Kinase A) dalam konteks ini diketahui terlibat dalam regulasi pigmentasi, melalui jalur MAPK yang dimediasi oleh AKAP (A-Kinase Anchoring Proteins)⁴⁷. Pada penelitian sebelumnya aktivitas MAPK dapat menurun kadarnya dengan *Exosome HMScs*¹⁷. Sehingga dapat terjadi penurunan aktivitas PKA. Pada penelitian sebelumnya juga di dapatkan bahwa PKA dapat mempengaruhi peningkatan aktivitas VEGFR. VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), sebagai regulator angiogenesis, mendukung aktivitas melanosit. Dalam kondisi hiperpigmentasi, aktivitas VEGFR yang tinggi dapat memperburuk hiperpigmentasi dengan meningkatkan suplai nutrisi dan oksigen ke melanosit. *Exosome* pada penelitian sebelumnya dapat menurunkan aktivitas VEGFR baik melalui transfer molekul bioaktif, seperti miRNA spesifik yang menghambat ekspresi VEGFR, sehingga produksi melanin dapat ditekan¹⁸.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB akan meningkatkan produksi ROS dalam keratinosit dan melanosit. Konsentrasi ROS yang tinggi menyebabkan kerusakan DNA, MAPK diaktifkan melalui serangkaian fosforilasi yang dimulai dari reseptor di membran sel dan berlanjut hingga aktivasi MAPK. Di sisi lain, PKA, adalah enzim yang diaktifkan oleh cAMP (*Cyclic Adenosine Monophosphate*). PKA terdiri dari subunit katalitik dan regulatori, di mana subunit katalitik tidak aktif saat terikat pada subunit regulatori^{10,12,13,60}.

Namun ada jalur lain selain melalui CAMP, yaitu *A-Kinase Anchoring Proteins* (AKAP) adalah protein yang berperan dalam menargetkan PKA ke lokasi spesifik dalam sel dengan mengikat subunit regulatori PKA. AKAP berfungsi sebagai scaffold protein, yang dapat mengatur lokasi subseluler dari PKA dan juga mendekatkan berbagai kinase dan fosfatase ke PKA untuk regulasi yang lebih efektif^{38,39,40,41,42}.

MAPK mengaktifasi PKA melalui fosforilasi yang melibatkan AKAP tanpa keterlibatan cAMP, MAPK dapat berinteraksi langsung dengan AKAP yang telah terikat pada kompleks PKA. Interaksi ini membawa MAPK ke dekat PKA, memungkinkan MAPK untuk memfosforilasi subunit regulatori PKA pada situs spesifik. Fosforilasi oleh MAPK ini mengakibatkan perubahan konformasi pada subunit regulatori PKA, yang

kemudian menyebabkan pelepasan subunit katalitik PKA. Kemudian terjadi induksi ekspresi MITF, pusat regulasi yang berperan dalam sintesis melanin yang menyebabkan terjadinya hiperpigmentasi^{25,28}.

Exosom, vesikel kecil yang disekresikan oleh berbagai jenis sel termasuk sel punca mesenkimal (MSC), memainkan peran penting dalam komunikasi antar sel. Dalam konteks hiperpigmentasi, *exosom* MSC dapat menghambat aktivitas *Protein Kinase A* (PKA) dan *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR), yang keduanya terlibat dalam proses pigmentasi kulit¹⁷.

Penghambatan ini dilakukan melalui mekanisme yang melibatkan jalur MAPK dan protein AKAP tanpa keterlibatan jalur cAMP, serta penghambatan langsung aktivitas VEGFR. Dalam menghambat aktivasi PKA, *exosom* MSC mengirimkan molekul bioaktif seperti *microRNA* (miRNA) dan protein yang dapat mempengaruhi jalur sinyal MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*).

MAPK adalah salah satu jalur penting yang mengatur berbagai proses seluler termasuk proliferasi, diferensiasi, dan stress seluler. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stemcell* mengandung *miRNA* yang dapat menargetkan komponen spesifik dari jalur MAPK, mengurangi aktivasi jalur ini dan dampaknya pada aktivasi PKA.

Selain itu, *Exosome Hypoxia MSCs* membawa protein yang dapat berinteraksi dengan *A-kinase anchoring proteins* (AKAPs), yang bertindak sebagai *scaffold* untuk PKA dan protein lainnya, memfasilitasi lokalisasi

PKA pada tempat-tempat tertentu dalam sel dan mengatur aktivitasnya. Protein yang dibawa oleh *exosom HMSCs* dapat mengganggu interaksi antara PKA dan AKAP, mencegah aktivasi PKA tanpa melalui jalur cAMP. Dengan demikian, sinyal yang biasanya meningkatkan produksi melanin melalui aktivasi PKA dapat dihambat, mengurangi aktivitas melanosit dan produksi melanin, yang pada akhirnya mengurangi hiperpigmentasi.

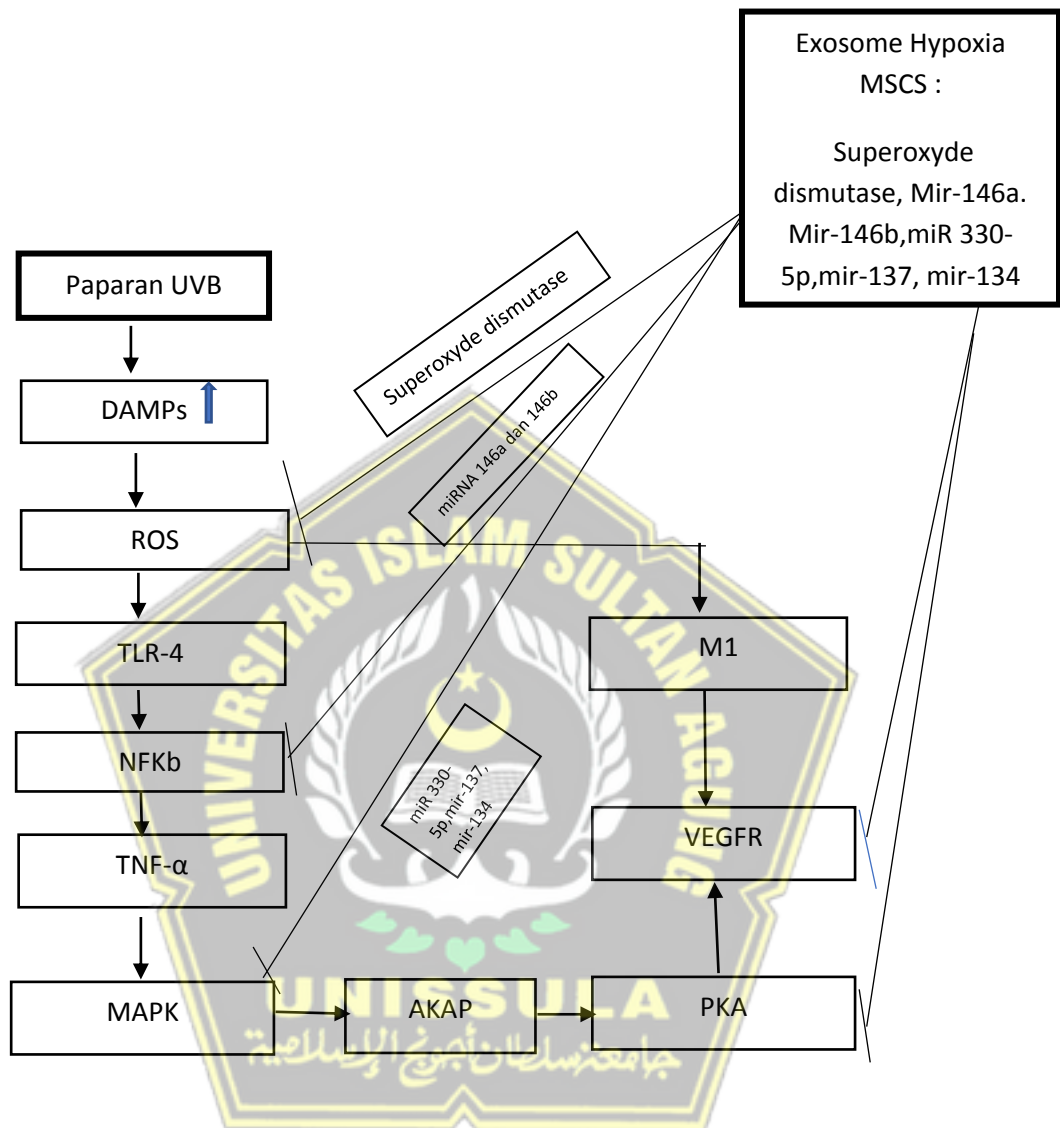
Dalam hal menghambat aktivitas VEGFR, *exosom MSC* juga memainkan peran penting. VEGFR adalah reseptor untuk *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), yang berperan dalam angiogenesis dan juga dapat mempengaruhi pigmentasi kulit melalui peningkatan melaninogenesis dan proliferasi melanosit. *Exosom HMSCs* mengandung *miRNA* dan protein yang dapat menekan ekspresi VEGFR atau menghambat jalur sinyal VEGF/VEGFR¹⁷.

MicroRNA dalam *exosom* dapat menargetkan *mRNA* VEGFR, untuk menghambat translasi, mengurangi jumlah reseptor VEGFR yang tersedia pada permukaan sel. Selain itu, *exosom* membawa molekul yang dapat menghambat aktivitas enzimatik VEGFR secara langsung. Molekul ini dapat berfungsi sebagai inhibitor *tirosin kinase* yang menghambat aktivitas enzimatik VEGFR, mencegah transduksi sinyal yang diperlukan untuk angiogenesis dan melaninogenesis⁶².

Dengan mengurangi aktivitas VEGFR, sinyal yang mempromosikan proliferasi melanosit dan produksi melanin dapat ditekan, yang pada akhirnya mengurangi hiperpigmentasi. Efek kombinasi dari penghambatan

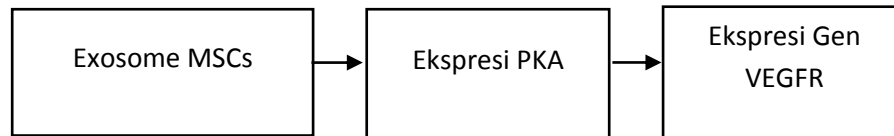
PKA melalui jalur MAPK dan AKAP serta penghambatan langsung VEGFR oleh komponen *exosom HMSCs* menghasilkan pengurangan produksi melanin berlebih, membantu dalam mengelola kondisi hiperpigmentasi.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

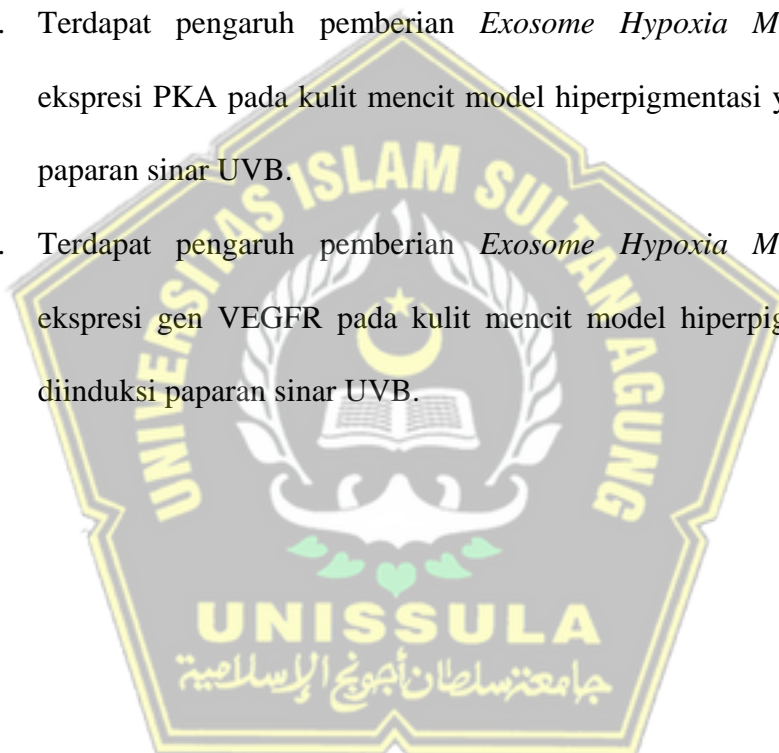
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia MSCs* terhadap ekspresi PKA pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.
2. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia MSCs* terhadap ekspresi gen VEGFR pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.



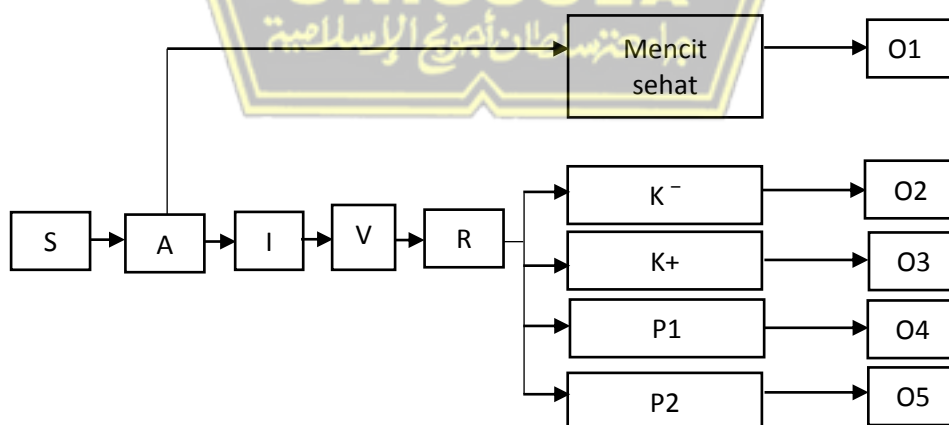
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilaksanakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *randomized post test only control group design* (rancang acak lengkap dengan lima kali pengulangan). Objek penelitian menggunakan mencit C57bl/6 dengan bobot berat badan 20-25 gram⁶³. Perlakuan terdiri dari :

- Kelompok : Mencit sehat
- Kelompok : Kontrol negative dengan NaCl 300 ml
- Kelompok : Kontrol positif retinol 0,1 % dalam 200 µl minyak zaitun⁶⁴.
- Kelompok : P1 (pemberian Exosome-Hypoxia MSCs dosis 200 µl)
- Kelompok : P2 (pemberian Exosome-Hypoxia MSCs dosis 300 µl)



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Subjek

A : Adaptasi

I : Induksi

V : Validasi

R : Randomisasi

P : Perlakuan

O : Observasi

4.2. Variabel dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Exosome Hypoxia MSCs dosis 200 μ l dan 300 μ l.

4.2.1.2. Variabel Antara

Ekspresi gen PKA pada hiperpigmentasi

4.2.1.3. Variabel Tergantung

Ekspresi VEGFR pada hiperpigmentasi

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. Dosis *Exosome-Hypoxia MSCs*

Dosis *Exosome Hypoxia MSCs* adalah pemberian injeksi subkutan yang mengandung *Exosome Hypoxia MSCs* dengan dosis 200 μ l dan 300 μ l. Exosome adalah larutan hasil filtrasi medium menggunakan TFF dengan ukuran filter 100-500kda, MSCs yang dikondisikan hipoksia 5% selama 24 jam.

Skala pengukurannya adalah skala ordinal.

4.2.2.2. Ekspresi PKA

Ekspresi PKA adalah jumlah ekspresi relative mRNA PKA yang diekspresikan oleh jaringan kulit pada sampel penelitian pada hari ke-28. Ekspresi PKA diukur menggunakan metode qRT-PCR.

Skala pengukurannya adalah skala rasio.

4.2.2.3. Ekspresi VEGFR

Ekspresi VEGFR adalah jumlah ekspresi relative mRNA VEGFR yang diekspresikan oleh jaringan kulit pada sampel penelitian pada hari ke-28. Ekspresi VEGFR diukur menggunakan qRT-PCR.

Skala pengukurannya adalah skala rasio.

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Populasi Penelitian

4.3.1.1. Populasi Target

Mencit C57bl/6 yang dikembangkan di *Animal Lab*

Model Stem Cell and Cancer Research Semarang.

4.3.1.2. Populasi Terjangkau

Mencit berusia 2 – 3 bulan, dengan bobot badan \pm 20-25 gram yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari *Animal Lab Model Stem Cell and Cancer Research* dan timbul hiperpigmentasi dengan paparan UVB 302 nm dengan MED 180 mJ/cm²⁶³.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *randomized sampling*. Mencit C57bl/6 dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok mencit sehat, K- (diberi paparan UVB 180 mJ/cm²) dan Nacl 300, K + (diberi sinar UVB dan retinol 0,1 %), P1 (diberi sinar UVB dan pemberian Exosome MSCS kadar 200µl), dan P2 (diberi sinar UVB dan pemberian *Exosome HMSCs* kadar 300 µl).

4.3.2.2. Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok. Sampel diambil dari populasi tersebut dan besarnya ditentukan berdasarkan rumus *Federer* sebagai berikut :

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

Keterangan :

n = Jumlah sampel tiap kelompok (5 kelompok)

t = Jumlah kelompok

Sampel tiap Kelompok :

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

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

$$(n-1) \times 4 \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5 \text{ (dibulatkan)}$$

Besar sampel untuk penelitian eksperimental ini berdasarkan rumus *federer* yakni setiap kelompok minimal 5 ekor. Jumlah kelompok pada penelitian ini sebanyak 5 kelompok, ditentukan jumlah hewan coba tiap kelompok sebesar 6 ekor, maka besar sampel secara keseluruhan adalah 30 ekor mencit C57bl/6.

1. Kriteria Inklusi

Mencit C57bl berusia 2 – 3 bulan, dengan bobot badan \pm 20-25 gram, aktif bergerak, tidak cacat, nafsu makan normal, tidak terdapat luka luar, dan mengalami hiperpigmentasi yang divalidasi dengan *masson-fontana*.

2. Kriteria Eksklusi

Mencit C57bl, antara lain memiliki kelainan anatomis, sudah pernah digunakan penelitian sebelumnya, mencit yang sakit sebelum masa penelitian.

3. Kriteria *Drop Out*

Mencit mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri dari *biosafety cabinet* (BSC), mikropipet,

incubator CO₂, dissecting kit, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan *hypoxic chamber*. *Oxygen meter* digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber*. Penelitian ini juga menggunakan peralatan berupa UVB light (*broadband* dengan *peak emission* pada 302 nm) dengan energi 180 mJ/cm² yang diberikan sebanyak 3 kali selama satu minggu hingga dua minggu untuk menginduksi hiperpigmentasi pada punggung mencit, steril swab untuk Injeksi *Exosome HMScs*. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi PKA dan VEGFR adalah RT – PCR (*Ilumina*).

4.4.2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat mencit, NaCl 0,9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah retinol, alkohol 70%, PBS, *ketamin*, *xylazine*.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Cara Perolehan *Etichal Clearance*

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

4.5.2. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cells (MSCs)* dari *Umbilical Cord*

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

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam waktu steril yang mengandung NaCl 0,9%.
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan di *petri dish*, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS.
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin menciit 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, *fungizone*, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan – pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinduksi 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. Proses *Hypoxia*

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

4.5.4. Pembacaan CD90, CD29, CD45, 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 *phosphate buffer saline (PBS) buffer*. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel / ml jika jumlah sel terbatas.

2. Siapkan tabung falcon 5 ml yang berisi reagen *flowcytometry* (tabel 2.1).
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 – 500 μ l *stain buffer (PBS)* atau 1 kali *washing buffer (FBS)*.
8. Baca di *flow cytometri*, 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 mice anti-human CD29	5 μ l
2	PE mice anti-human CD90	5 μ l
3	PerCP-CyTm 5.5 mice anti-human CD45	5 μ l
4	APC mice anti-human CD31	5 μ l
5	Kosong	-
6	hMSC positive isotype control cocktail hMSC negative isotype control cocktail	20 μ l
7	hMSC positive cocktail PE hMSC negative cocktail	20 μ l 20 μ l

4.5.5. Pembuatan *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stemcell*

Exosome MSCs diisolasi menggunakan metode TFF. Langkah yang dilakukan antara lain media kultur MSCs dikumpulkan di dalam botol steril dan disaring menggunakan alat uPulse TFF dengan filter 100 kDa dan 500 kDa untuk menyisihkan partikel besar. Hasil filtrasi kemudian dilakukan validasi kandungan EH-MSCs menggunakan flowcytometry dengan penanda permukaan berupa CD81, CD63, dan CD9. Hasil yang telah tervalidasi mengandung EH-MSCs disimpan dalam tabung 2,5 ml dan dalam suhu 2-8 °C.

4.5.6. Pemaparan Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Penelitian

1. Mencit diadaptasi selama 7 hari
2. Rambut pada bagian punggung mencit dicukur dengan clipper hingga bersih
3. Punggung mencit yang telah dicukur seluas 5x5 cm di iradiasi dengan UVB light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan 180 mJ/cm² sebanyak 3 kali seminggu (hari 1, 3, dan 5) 9 menit selama 2 minggu.

4.5.7. Setelah pemaparan UVB selama 2 minggu, mencit kontrol negative diberikan Nacl 300 ml , mencit kontrol positif diberikan retinol 0,1% dalam 200µl minyak zaitun , mencit perlakuan diberikan injeksi exosome 1x di hari ke-15 dengan dosis 200 µl dan 300 µl/kgBB.

4.5.8. Terminasi dan Pengambilan Jaringan

1. Terminasi mencit dengan menggunakan *cocktail* dosis lethal sebelum dilakukan pengambilan organ. Untuk pembuatan 10ml *cocktail* digunakan ketamine 50 mg/kgBB, xylazine 10 mg/kgBB dan acepromazine 2 mg/kgBB yang diinjeksikan IP.
2. Setelah mencit mati, dilakukan koleksi organ kulit kemudian disimpan dalam *cryotube* yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later.

4.5.9. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA

1. Sampel kulit difiksasi dalam formalin 10 % dan dibuat menjadi blok paraffin.
2. Sampel kulit sebanyak 100 mg diambil dari RNA later kemudian dipotong menjadi bagian – bagian kecil dimasukkan ke dalam tube yang telah terisi 50 ml RNA Iso Plus.
3. Potongan kulit ditumbuk menggunakan *micopastle* dan ditambahkan lagi RNAIso Plus sebanyak 50 ml dan disimpan disuhu ruang selama 5 menit.

4. Ditambahkan 20 ml chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
5. Inkubasi pada suhu ruang selama 2 – 3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C hingga larutan dalam tube terlibat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris – debris sel.
6. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung sentrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanolol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
7. *Tabung Eppendorf* digoyang – goyangkan hingga muncul benang – benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40°C. Supernatan dibuang sampai terlihat pellet berwarna putih didasar tabung.
8. Setelah kering ditambahkan 100 ml etanol 70 % dalam larutan (*diethyl pyrocarbonat*) DEPC lalu bolak balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40°C.
9. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30 – 50 μ m. campuran pada suhu 55°C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA *solution* dan disimpan pada suhu -80°C

RNA dikuantifikasi dengan *nanodrop*. Hasil kuantifikasi dihitung dijadikan 3000 ng.

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

4.5.10. Prosedur Pembuatan Preparat dan Pembacaan Hiperpigmentasi

1. Sampel kulit difiksasi dalam formalin 10 % dan dibuat menjadi blok paraffin.
2. Sampel diwarnai dengan *masson- fontana staining*.
3. Ketebalan setiap bagian epidermis dari lapisan basal ke stratum korneum diukur dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan mikrometer okuler.
4. Ketebalan setiap bagian ditentukan dengan imageJ software.
5. Hasil pengukuran kemudian dibandingkan dengan kontrol dan mencit sehat.

4.5.11. Prosedur Pembacaan Ekspresi PKA dan VEGFR dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1. Ekspresi mRNA dari PKA dianalisis menggunakan RT-PCR. Campuran dari 3 μ l cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, *Taq DNA polymerase*, *reaction buffer* and $MgCl_2$) sebanyak 12,5 μ l, primer spesifik pada gen PKA target sebanyak 0,6 μ l untuk primer forward 5'-ATGACAGACCTTCCTGAGCA-3' dan reverse 5'-CTCCTTGGGACTTGGCTTTG-3' dan 8,3 μ l *Nuclease Free Water*.
2. Ekspresi mRNA dari VEGFR dianalisis menggunakan RT-PCR. Campuran dari 3 μ l cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, *Taq DNA polymerase*, *reaction buffer* and $MgCl_2$) sebanyak 12,5 μ l, primer spesifik pada gen VEGF-R target sebanyak 0,6 μ l untuk primer forward 5'-GTTTCAGAGCGGAGAAAGCATT-TG-3' dan reverse 5'-CACATCTGCAAG-TACGTTTCGTTT-3' dan 8,3 μ l *Nuclease Free Water*.
3. Ekspresi gen house keeping *GAPDH* digunakan sebagai baseline dengan primer forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGAGTC-3' dan reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'.
4. PCR produk dianalisis menggunakan qRT-PCR illumina.
5. Peningkatan ekspresi gen dianalisis dalam ratio peningkatan terhadap *housekeeping* gen menggunakan software EcoStudy.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell & Cancer Research (SCCR)*,

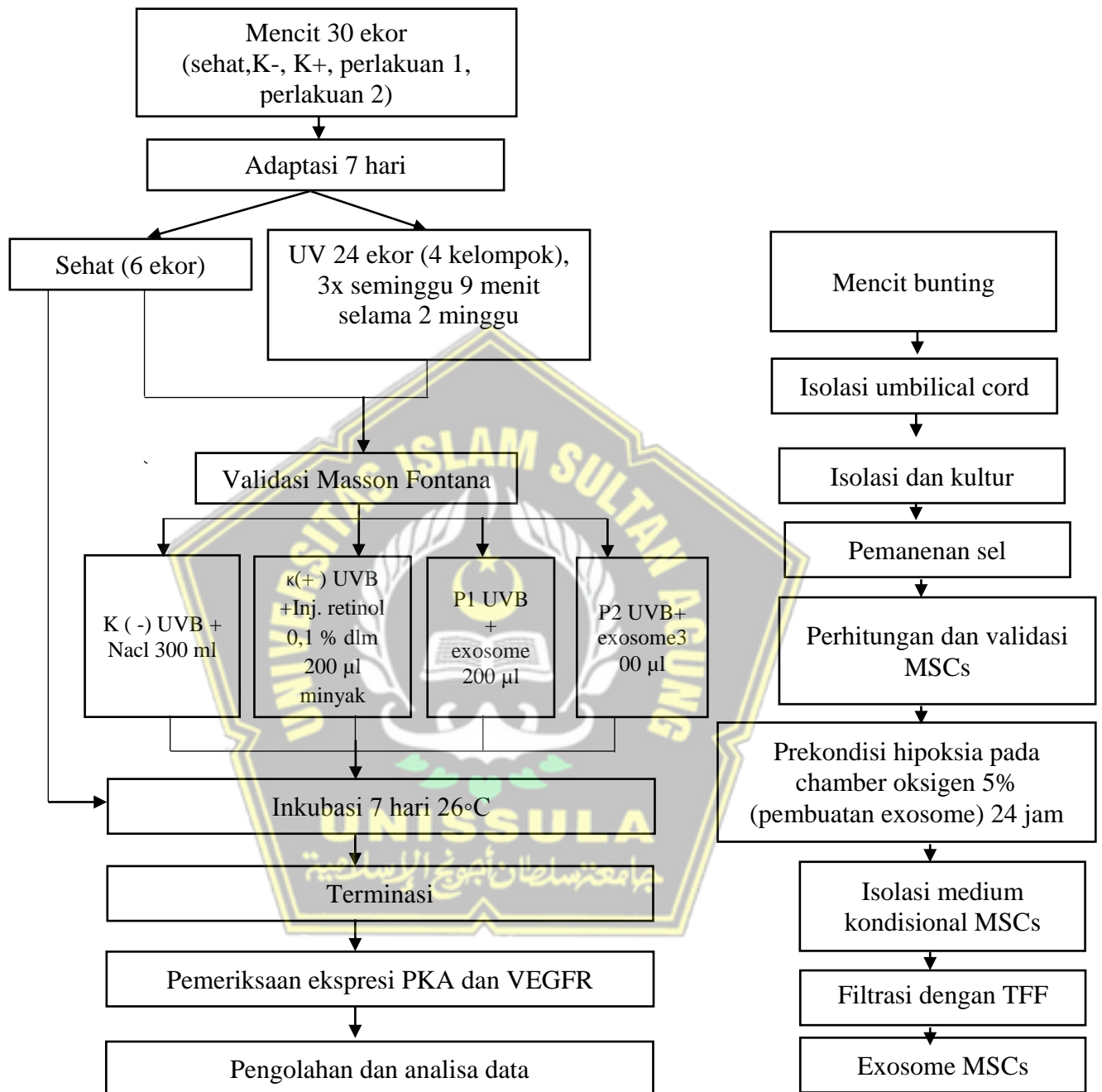
4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2024

4.7. Analisis Data

Data yang sudah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Saphiro Wilk* dan uji varian data dengan uji *Levene Statistic*. Pada uji normalitas dan homogenitas didapatkan $p > 0,05$, maka data berdistribusi normal dan homogen, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji statistik parametrik yaitu *One Way Anova*, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing – masing kelompok. Apabila terdapat data berdistribusi normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji statistik parametrik *One Way Anova*, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui perbedaan masing – masing kelompok. Apabila terdapat sebaran data tidak normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing – masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0 for windows

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

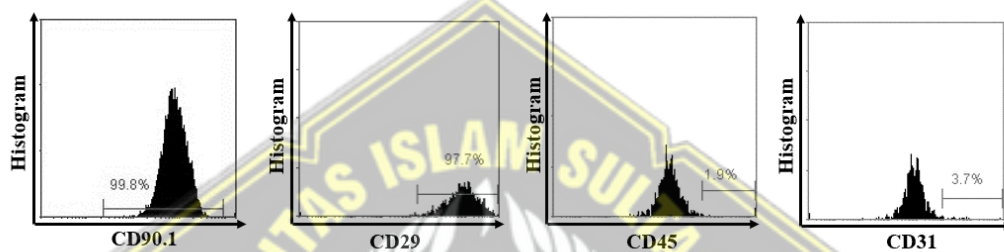
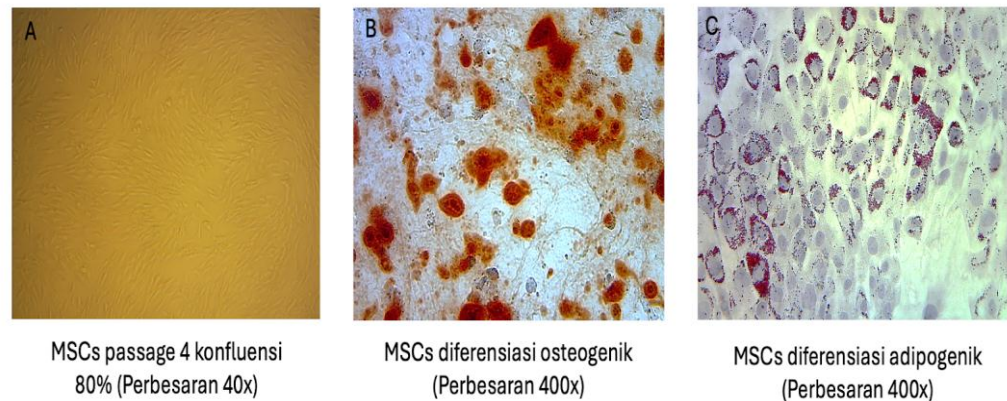
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Validasi MSCs

Mesenchymal stem cell diisolasi di Laboratorium SCCR Indonesia, Semarang, dengan menggunakan tali pusat mencit bunting yang berusia 21 hari. Setelah isolasi, sel-sel ini dikultur dalam cawan petri yang berisi medium spesifik yang dirancang untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel punca. Selama proses kultur, sel-sel tersebut diperhatikan dan dirawat dengan hati-hati untuk memastikan kondisi optimal. Setelah mencapai pasase kelima, gambaran sel-sel tersebut menunjukkan adhesi yang kuat pada dasar cawan petri dengan morfologi sel yang menyerupai spindle saat diamati di bawah mikroskop, menunjukkan karakteristik khas dari *mesenchymal stem cell yang sehat dan aktif* (lihat Gambar 5.1).



Karakterisasi marker MSC

Gambar 5.1. (A) morfologi MSC berbentuk fibroblas-like (ditunjuk oleh anak panah) pada perbesaran 100x. (B) Pengecatan Alizarin Red menandakan adanya deposisi kalsium. (C) Pengecatan Oil Red O menandakan adanya deposisi lemak. (D) Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31

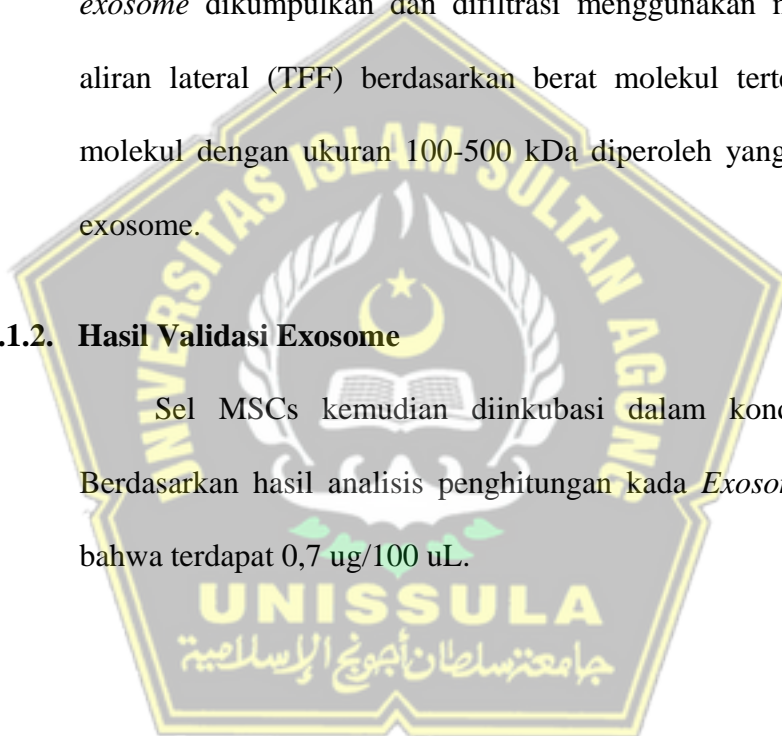
Marker sel MSC kemudian divalidasi menggunakan analisis *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSC dalam mengekspresikan berbagai *surface marker khusus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel yang diisolasi dapat mengekspresikan CD29 (97,7%) dan CD90 (98,80%), sementara hanya sedikit mengekspresikan CD45 (1,9%) dan CD31 (3,7%). Penelitian ini juga mengevaluasi kemampuan MSC untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa. MSC diberi medium penginduksi diferensiasi osteosit maupun adiposit. Hasilnya menunjukkan bahwa sel yang diisolasi dapat berdiferensiasi menjadi osteosit dan adiposit,

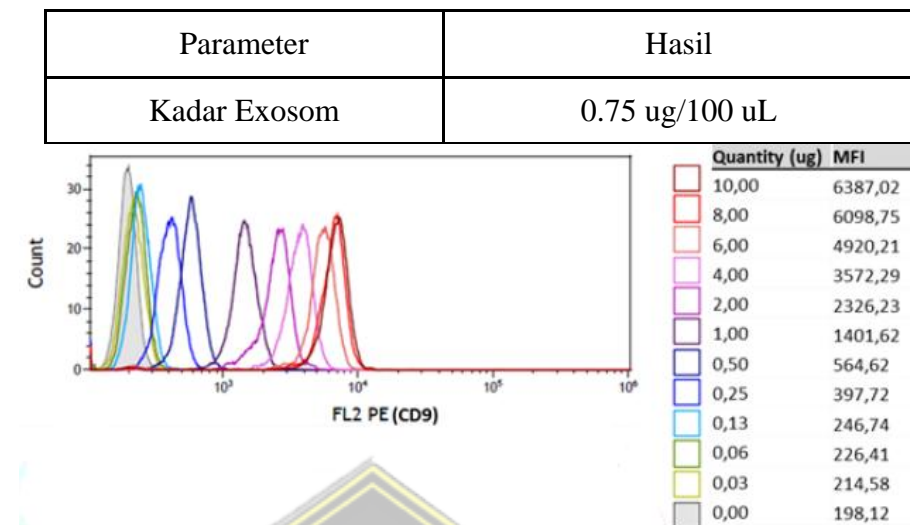
yang ditandai dengan adanya endapan kalsium dan lemak yang terwarnai merah menggunakan pewarna Alizarin Red dan Oil Red O.

Sel *MSCs* kemudian ditempatkan dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam menggunakan *chamber* hipoksia. Setelah itu, medium kultur MSC yang mengandung *exosome* dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode filtrasi aliran lateral (TFF) berdasarkan berat molekul tertentu sehingga molekul dengan ukuran 100-500 kDa diperoleh yang mengandung *exosome*.

5.1.2. Hasil Validasi Exosome

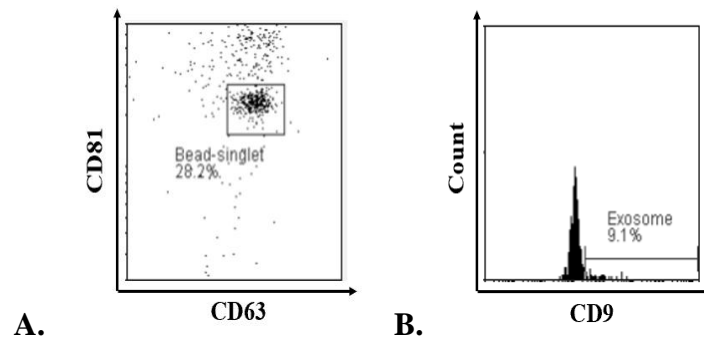
Sel *MSCs* kemudian diinkubasi dalam kondisi Hypoxia. Berdasarkan hasil analisis penghitungan kada *Exosome* ditemukan bahwa terdapat 0,7 ug/100 uL.





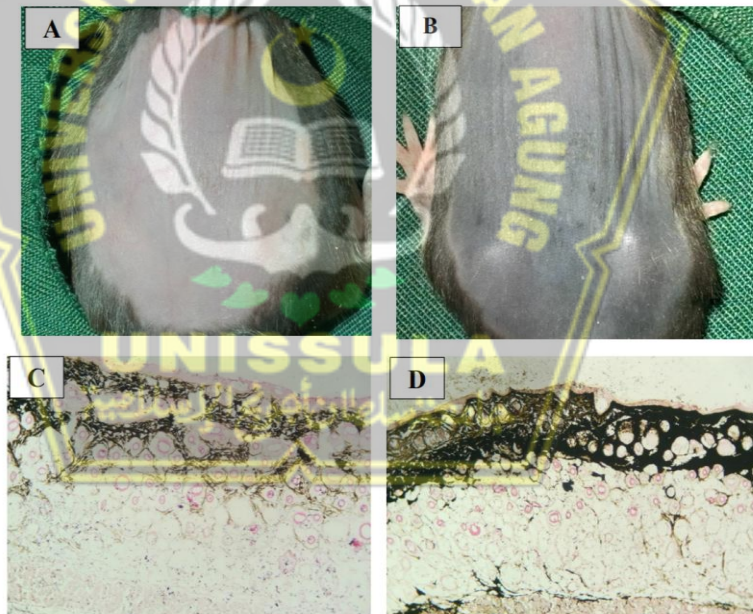
Gambar 5.2. Grafik menunjukkan sumbu X sebagai jumlah fluoresensi yaitu jumlah DNA relatif, sumbu Y adalah jumlah sel yang diukur. Semakin banyak fluoresensi yang dipancarkan, semakin ke kanan data sel akan muncul pada histogram. Exosome yang semakin ke kanan semakin tinggi konsentrasinya dan peak 10^3 digunakan karena paling jauh jarak dengan yang lainnya, antara peak warna biru 0,5 dan warna coklat 1 ug diestimasi 0,75 μ g.

Selanjutnya *Hypoxia* MScs divalidasi menggunakan Flowcytometry untuk memastikan bahwa sel terfiltrasi mengandung marker exosome caranya dengan melihat kuantifikasi marker Exosome yang terbaca yaitu CD63, CD81, CD9. Hasilnya, jumlah exosome yang terbaca dianalisis Flowcytometry menggunakan marker CD81, CD63, CD9 Positif 9,1 %.



Gambar 5.3. (A). Grafik menunjukkan eksosom yang mengekspresikan penanda permukaan CD63 (sumbu X) dan CD81 (sumbu Y) dengan 28,2% bead singlet, yang artinya setiap bead hanya mengikat satu eksosom. (B) Hanya 9,1% eksosom dalam sampel mengekspresikan penanda CD9.

5.1.3. Hasil Validasi Hiperpigmentasi



Gambar 5.4. Gambar Validasi Hiperpigmentasi. Tikus kelompok sehat warna kulit masih normal (A). tikus yang disinari UVB-terlibat jelas warna kulit sudah berwarna gelap (B), Melanin yang ditunjukkan dengan warna pink lebih banyak terlihat pada tikus sehat (C), dibandingkan dengan tikus yang terpapar UVB atau tikus yang sudah mengalami hiperpigmentasi (D).

Setelah mencit mengalami hiperpigmentasi, kemudian mencit dibagi menjadi 4 kelompok yaitu K- (control negatif dengan NaCl 300 ml), K+ (mencit yang diinjeksikan retinol 0,1 % dalam 200 μ l minyak zaitun), P1 (mencit yang diinjeksikan *Exosome MSCs* dosis 200 μ L) dan P2 (mencit yang diinjeksi *Exosome- MSCs* dosis 300 μ L). Kemudian Mencit diinkubasi selama 7 hari dalam suhu 26 °C.

5.1.4. Ekspresi PKA dan VEGFR

Data diuji distribusi normalitas dan homogenitas pada masing-masing kelompok. Hasil analisis menunjukkan bahwa distribusi data kadar PKA dan kadar VEGFR pada keempat kelompok tersebut adalah normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas varian data menggunakan uji Levene menunjukkan bahwa PKA homogen dan VEGFR bersifat tidak homogen.

Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas untuk PKA dan VEGFR, analisis data dilanjutkan menggunakan uji One Way Anova untuk menilai perbedaan distribusi data dengan nilai $p < 0,05$. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa data kadar PKA dan VEGFR berbeda secara signifikan ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *Exosome- MSCS* berpengaruh signifikan terhadap kadar PKA dan VEGFR minimal pada satu kelompok perlakuan

Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Kadar PKA dan VEGFR (dari data deskriptif

Variabel	Kelompok				
	SH	K-	K+	P1	P2
VEGF-R					
Nilai	1,03 ±0,01	3,29±0,01	2,45 ±0,07	1,77±0,08	1,19 ±0,07
Shapiro Wilk (dari data uji normalitas)					>0,05
Lavene test (dari data uji homogenitas)					<0,05
One Way Anova					<0,05
PKA					
Nilai	1,05±0,0 2	3,09±0,11	2,43 ±0,12	1,63±0,07	1,13±0,07
Shapiro Wilk					>0,05
Lavene test					> 0,05
One way anova					<0,05

Berdasarkan analisis One Way Anova PKA yang signifikan, data dianalisis dengan uji Post Hoc LSD agar dapat menentukan perbandingan kelompok dengan signifikansi $p < 0,05$. Hasilnya analisis Post hoc data PKA seperti yang ditampilkan pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa K+ yang diinjeksikan retinol, dapat menurunkan ekspresi PKA 22 %, P1 yang diinjeksikan Exosome 200 μg dapat menurunkan ekspresi PKA 47 %, P2 yang diinjeksikan Exosome 300 μg , dapat menurunkan ekspresi PKA 63 %.

Tabel 5.2. Uji Post Hoc LSD PKA

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
SH	K-	<0,001
	K+	<0,001
	P1	<0,001
	P2	0,191
K-	SH	<0,001
	K+	<0,001
	P1	<0,001
	P2	<0,001
K+	SH	<0,001
	K-	<0,001
	P1	<0,001
	P2	<0,001
P1	SH	<0,001
	K-	<0,001
	K+	<0,001
	P2	<0,001
P2	SH	0,191
	K-	<0,001
	K+	<0,001
	P1	<0,001

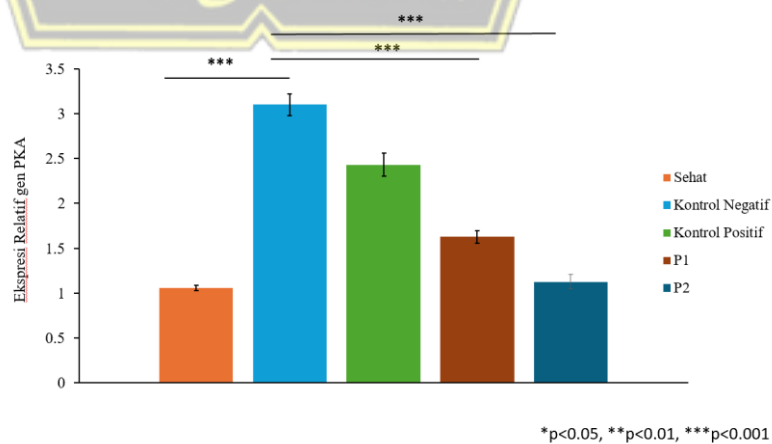
Berdasarkan data kadar VEGFR yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji Post Hoc Tamhane, karena data bersifat normal dan tidak homogen. Data hasil uji post hoc tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.3. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K+ yang diinjeksikan retinol menurunkan ekspresi VEGFR sebesar 25 %,

P1 yang diinjeksikan Exosome 200µg menurunkan ekspresi VEGFR sebesar 46%, dan P2 yang diinjeksikan Exosome 300 µg menurunkan ekspresi VEGFR sebesar 65 %.

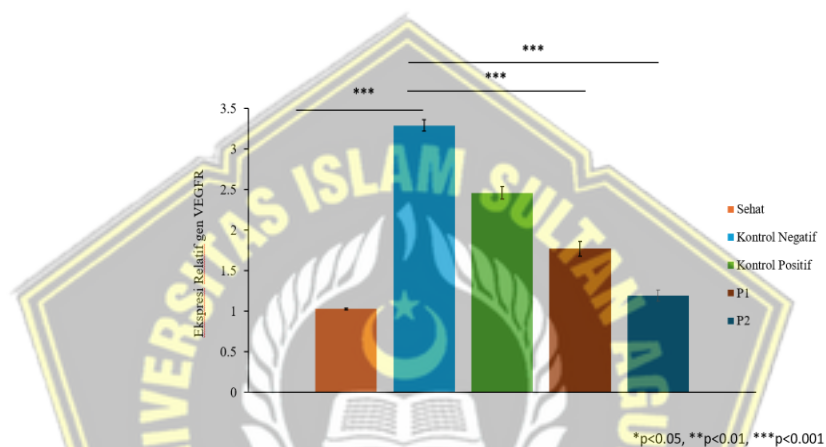
Tabel 5.3. Uji Post Hoc Tamhane VEGFR

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
SH	K-	<0,001
	K+	<0,001
	P1	<0,001
	P2	<0,031
K-	SH	<0,001
	K+	<0,001
	P1	<0,001
	P2	<0,001
K+	SH	<0,001
	K-	<0,001
	P1	<0,001
	P2	<0,001
P1	SH	<0,001
	K-	<0,001
	K+	<0,001
	P2	<0,001
P2	SH	<0,031
	K-	<0,001
	K+	<0,001
	P1	<0,001

Berdasarkan hasil analisa statistika, didapatkan bahwa terdapat penurunan ekspresi PKA dan VEGFR dengan dosis injeksi yang lebih besar.

**Gambar 5.5.** Grafik Ekspresi Relatif gen PKA

Pada Grafik Ekspresi relatif gen PKA menandakan, perbandingan antara Kelompok SH dengan K- memiliki signifikansi $p < 0,001$, K- dengan P1 memiliki signifikansi $p < 0,001$, K- dengan P2 memiliki signifikansi $p < 0,001$. Yang berarti terdapat perbedaan signifikan antara kelompok SH dan K-, K- dengan P1, K- dengan P2.



Gambar 5.6. Grafik Kadar VEGFR

Pada Grafik Ekspresi relatif gen VEGFR menandakan, perbandingan antara Kelompok SH dengan K- memiliki signifikansi $p < 0,001$, K- dengan P1 memiliki signifikansi $p < 0,001$, K- dengan P2 memiliki signifikansi $p < 0,001$. Yang berarti terdapat perbedaan signifikan antara kelompok SH dan K-, K- dengan P1, K- dengan P2.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Hiperpigmentasi pada penelitian ini, disebabkan karena pengaruh UVB sehingga mengaktifkan DAMPS, molekul yang dilepaskan oleh sel-

sel tubuh yang mengalami kerusakan atau stres. Molekul-molekul ini memicu respon inflamasi untuk melawan ancaman sehingga dapat memicu produksi ROS, kemudian DAMPS ini dapat dikenali oleh TLR-4 yaitu reseptor yang dapat menerima DAMPS⁷⁰, dan mempengaruhi faktor transkripsi NF κ B yang dapat memicu sitokin proinflamasi yaitu TNF- α yang nantinya akan mempengaruhi kompleks MAPK yang menggunakan AKAP untuk berfosforilasi dengan PKA sehingga PKA aktivitasnya akan meningkat, dengan peningkatan PKA akan mempengaruhi peningkatan aktivitas VEGFR.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dampak pemberian *Exosome-MSCs* dengan kadar berbeda (200 uL dan 300 uL) pada mencit dengan hiperpigmentasi. Temuan penelitian menunjukkan bahwa kedua dosis injeksi *Exosome-MSCs* berhasil menurunkan kadar PKA dan VEGFR. Selain itu, hasil menunjukkan bahwa injeksi *Exosome-MSCs* dengan kadar 200 uL dan 300 uL memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menurunkan PKA dan VEGFR. Selain itu, penelitian ini juga menemukan bahwa injeksi *Exosome-MSCs* kadar 200 uL berbeda dengan dosis yang lebih tinggi (300 uL).

Mesenchymal Stem Cell yang digunakan dalam penelitian ini memiliki keunggulan dengan sifat anti-inflamasi⁵³. Dalam konteks hiperpigmentasi, peradangan kronis sering kali memperburuk masalah dengan memicu produksi melanin berlebih. MSC, melalui sekresi eksosom dan sitokin, dapat menurunkan peradangan dengan menghambat jalur pro-

inflamasi seperti NF- κ B dan MAPK, yang pada akhirnya membantu mengurangi hiperpigmentasi. Selain itu, MSC memiliki kemampuan untuk mengatur proses melanogenesis, yaitu produksi melanin di kulit. Exosom yang dilepaskan oleh MSC mengandung berbagai miRNA dan protein yang berperan penting dalam mengontrol jalur-jalur molekuler seperti MITF (Microphthalmia-associated transcription factor), yang merupakan factor sintesis melanin. Dengan menekan jalur ini, MSC berperan dalam mengurangi aktivitas melanosit, sehingga mencegah peningkatan melanin yang menyebabkan hiperpigmentasi. Selain itu, MSC juga dapat meregenerasi dan penyembuhan kulit. MSC dapat memperbaiki dan meremajakan jaringan kulit yang rusak, yang penting dalam pemulihan setelah trauma atau kerusakan akibat paparan sinar UV, salah satu penyebab utama hiperpigmentasi. Dengan merangsang produksi kolagen dan elastin, MSC mendukung pembentukan kulit baru yang lebih sehat, memperbaiki tekstur kulit, dan mengurangi dampak kerusakan yang disebabkan oleh hiperpigmentasi^{71,72}.

Dalam hal jalur molekuler, MSC juga dapat memodulasi sinyal yang terlibat dalam produksi melanin, seperti jalur MAPK/ERK. Dengan menghambat jalur, MSC menekan aktivitas melanosit dan mengurangi pigmentasi berlebihan pada kulit¹⁸.

Selain itu, terapi MSC lebih bersifat natural dan non-invasif dibandingkan dengan beberapa prosedur pengobatan hiperpigmentasi lainnya, seperti penggunaan laser atau pengelupasan kimia. MSC bekerja

secara alami dalam tubuh, memperbaiki kulit dari dalam tanpa merusak jaringan di permukaan kulit.

Penggunaan MSC tidak hanya memberikan efek jangka pendek dalam mengatasi pigmentasi, tetapi juga memiliki manfaat jangka panjang dengan memperbaiki struktur dan fungsi kulit secara keseluruhan. Hal ini memberikan hasil yang lebih tahan lama, berbeda dengan beberapa terapi lain yang mungkin hanya memberikan perbaikan sementara^{71,72}.

Pada penelitian sebelumnya terbukti bahwa Exosome dapat menghambat ROS dimana exosome mengandung enzim antioksidan seperti superoxide dismutase yang mampu menetralkan ROS di sel target^{65,18}. Exosome juga dapat mengangkut miRNA-146a dan 146b yang dapat menurunkan ekspresi protein TRAF6, sehingga menghambat aktivasi NF- κ B⁶⁶. Selain itu, Exosome memiliki miR-330-5p, miR-137, atau miR-143 yang dapat menghambat jalur MAPK^{18,68,69}. Pada penelitian sebelumnya, Exosome menghambat MITF sehingga menekan produksi melanin²⁷. Exosome memiliki miR-330-5p, miR-181a-5p dan miR-199a menghambat proses melanogenesis sehingga mengurangi produksi melanin^{27,67}.

Exosome- MSCs menunjukkan potensi besar dalam mengatasi hiperpigmentasi akibat paparan UVB. Dalam konteks ini, jalur terlibat dalam regulasi produksi melanin adalah MAPK dan PKA yang dimediasi oleh AKAP. Paparan UVB merangsang keratinosit dan fibroblas kulit untuk memproduksi VEGF, yang berinteraksi dengan reseptor VEGFR pada

melanosit. Aktivasi VEGFR memulai sinyal yang berjalan melalui jalur MAPK. Jalur MAPK adalah jalur sinyal penting yang terlibat dalam berbagai proses seluler, termasuk pertumbuhan dan diferensiasi sel. Dalam melanosit, aktivasi MAPK memicu ekspresi enzim yang penting untuk produksi melanin, seperti tyrosinase, yang berperan dalam proses melanogenesis. Hubungan antara MAPK dan PKA diatur oleh AKAP yang merupakan protein penyangga, yang mengarahkan PKA ke lokasi-lokasi spesifik dalam sel.

Setelah PKA diaktifkan melalui jalur ini, ia juga dapat memengaruhi sinyal VEGFR secara langsung. PKA dapat mempengaruhi VEGFR dengan memfasilitasi fosforilasi komponen hilir dari reseptor ini, yang meningkatkan sensitivitas reseptor terhadap ligannya, yakni VEGF. Ini berarti bahwa aktivitas PKA tidak hanya berperan dalam peningkatan melanogenesis, tetapi juga dapat memperkuat sinyal yang diterima oleh VEGFR, memperparah produksi melanin.

Exosome MSCs mengintervensi jalur ini pada beberapa titik penting. Exosome mengandung molekul bioaktif, seperti miRNA, yang dapat menekan ekspresi AKAP di dalam sel melanosit. Dengan menurunkan ekspresi AKAP, exosome MSCs secara efektif mengganggu hubungan antara MAPK dan PKA, sehingga menurunkan aktivasi PKA dan menekan proses fosforilasi CREB. Ini akan menurunkan ekspresi gen-gen melanogenesis seperti tyrosinase, yang mengarah pada penurunan produksi melanin.

Dengan menurunkan aktivitas PKA, exosome MSCs juga dapat mengurangi aktivitas VEGFR. Hal ini dilakukan dengan menekan sensitivitas VEGFR terhadap VEGF, yang mengurangi sinyal melanogenesis lebih lanjut yang diinduksi oleh paparan UVB. Dengan cara ini, exosome MSCs tidak hanya mengganggu jalur MAPK-PKA melalui AKAP, tetapi juga memutus umpan balik positif antara PKA dan VEGFR, sehingga lebih efektif dalam menekan produksi melanin dan mengurangi hiperpigmentasi.

Penelitian ini memberikan wawasan yang berharga, namun tidak terlepas dari beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan untuk penelitian lanjutan. Beberapa keterbatasan penelitian yaitu model hewan yang digunakan, yaitu mencit, meskipun memiliki perbedaan signifikan, tidak dapat sepenuhnya merefleksikan kompleksitas kulit manusia. Sistem imun, struktur kulit, dan metabolisme mencit berbeda dengan manusia, yang dapat memengaruhi hasil penelitian. Untuk keterbatasan yang lainnya, walaupun grafik ekspresi PKA dan VEGFR dalam penelitian ini dosis *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* sudah sama dengan kelompok sehat, penelitian selanjutnya juga dapat meneliti dosis exosome yang lebih tinggi untuk mengetahui dosis maksimal dan apakah dengan dosis lebih tinggi ada potensi efek samping yang mungkin terjadi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh pemberian Exosome-MSCs terhadap penurunan kadar PKA dan VEGFR pada mencit dengan hiperpigmentasi:

1. Terbukti adanya perbedaan kadar PKA pada kelompok P1 dan P2 yang diberi Exosome dengan dosis 200uL dan 300uL dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Terbukti adanya perbedaan kadar VEGFR pada kelompok P1 dan P2 yang diberi Exosome dengan dosis 200uL dan 300uL dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

Studi yang akan datang diharapkan dapat menganalisa pengaruh *exosome* terhadap manusia agar lebih aplikatif. Dan dosis yang ditingkatkan dapat dipertimbangkan untuk mengetahui apakah dengan dosis yang lebih tinggi ada potensi menimbulkan efek samping. Sehingga dosis maksimal dari *exosome* dapat diketahui lebih detail.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nautiyal A, Wairkar S. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2021 May 17. doi: 10.1111/pcmr.12986
2. Xing X, Dan Y, Xu Z, Xiang L. Implications of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of hyperpigmentation disorders. *J Dermatol*. 2022;2022:1-17. doi: 10.1155/2022/12345678.
3. Ganguly B, Hota M, Pradhan J. Skin Aging: Implications of UV Radiation, Reactive Oxygen Species and Natural Antioxidants. In: *Reactive Oxygen Species* [Internet]. IntechOpen; 2021 [cited 2023 Jul 6]. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.100102>
4. Kumara JP, Mandal BB. The inhibitory effect of silk sericin against ultraviolet-induced melanogenesis and its potential use in cosmeceutics as an anti-hyperpigmentation compound. *Photochem Photobiol Sci*. 2019 Aug Available from: <https://doi.org/10.1039/c9pp00211b>
5. Kang, H. Y., Lee, J. W., Papaccio, F., Bellei, B., & Picardo, M. (2021). Alterations of the pigmentation system in the aging process. *Experimental Dermatology*, doi:10.1111/pcmr.12994.
6. Zhang L, Liang S, Zhang Z, Wang K, Cao J, Yao M, Qin L, Qu C, Miao J. Protective Effects of ζ -Carotene-like Compounds against Acute UVB-Induced Skin Damage. *Int J Mol Sci*. 2023;24(18):13970. doi: 10.3390/ijms241813970.
7. Fang M, Lee HM, Oh S, Zheng S, Bellere AD, Kim M, Choi J, Kim M, Yu D, Yi TH. *Rosa davurica* inhibits skin photoaging via regulating MAPK/AP-1, NF- κ B, and Nrf2/HO-1 signaling in UVB-irradiated HaCaTs. *Photochem Photobiol Sci*. 2022;21:2217-2230. doi: 10.1007/s43630-022-00290-4.
8. Murase D, Hachiya A, Amano Y, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y. The Essential Role of p53 in Hyperpigmentation of the Skin via Regulation of Paracrine Melanogenic Cytokine Receptor Signaling. *J Biol Chem*. 2009 Feb;284(6):4343-53. doi: 10.1074/jbc.M805570200.

9. Pan, C., Liu, X., Zheng, Y., Zhang, Z., Li, Y., Che, B., Liu, G., Zhang, L., Dong, C., Aisa, H. A., Du, Z., & Yuan, Z. The mechanisms of melanogenesis inhibition by glabridin: molecular docking, PKA/MITF and MAPK/MITF pathways. *Food Science and Human Wellness*, 12, 1–9. 2023 <http://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.011>
10. Isensee J, Spangenberg H, Ramos LS, Osswald M, Stumpf A, Künneke L, et al. The role of autophosphorylation of the type II regulatory subunit in activation of protein kinase A (PKA) has been a longstanding question. *J Cell Biol.* 2018 May 17;217(6):2020105011. doi:10.1083/jcb.201805011.
11. Donelson-Smith F, Scott JD. Protein kinase A activation: Something new under the sun? *J Cell Biol.* 2018 May 17;217(6):2020708053. doi:10.1083/jcb.201708053.
12. Na YR, Kwon JW, Kim DY, Chung H, Song J, Jung D, Quan H, Kim D, et al. Protein Kinase A Catalytic Subunit Is a Molecular Switch that Promotes the Pro-tumoral Function of Macrophages. *Cell Rep.* 2020;33(5):107643. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107643.
13. Ntellas P, Mavroeidis L, Gkoura S, Gazouli I, Amylidi AL, Papadaki A, et al. Old Player-New Tricks: Non Angiogenic Effects of the VEGF/VEGFR Pathway in Cancer. *Cancers.* 2020 Oct 27;12(11):3145. doi:10.3390/cancers12113145.
14. Zhu JW, Ni YJ, Tong XY, Guo X, Wu XP. Activation of VEGF receptors in response to UVB promotes cell proliferation and melanogenesis of normal human melanocytes. *Exp Cell Res.* 2019; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111798>.
15. Murniastuti DS, Etnawati K, Pudjiati SR. The correlation between severity of melasma with facial wrinkles in Yogyakarta, Indonesia. *Dermatology Reports.* 2020;12:8390. DOI: 10.4081/dr.2020.8390.
16. Goh CL, Kang HY, Morita A, Zhang C, Wu Y, Prakoeswa CRS, et al. Awareness of sun exposure risks and photoprotection for preventing pigmentary disorders in Asian populations: Survey results from three Asian countries and expert panel recommendations. *Photodermatology.* 2023. DOI:

10.1111/phpp.12932

17. Bhat A, Yadav J, Thakur K, Aggarwal N, Tripathi T, Chhokar A, Singh T, Jadli M, Bharti AC. Exosomes from cervical cancer cells facilitate pro-angiogenic endothelial reconditioning through transfer of Hedgehog–GLI signaling components. *Cancer Cell Int.* 2021;21:319. doi: 10.1186/s12935-021-02026-3.
18. Luan Z, Liu J, Li M, Wang Y, Wang Y. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stemcells inhibit the NF-κB/MAPK signaling pathway and reduce the inflammatory response to promote recovery from spinal cord injury. *J Orthop Surg Res.* 2024;19(184). doi:10.1186/s13018-024-04651-w
19. Thakur A, Shah D, Rai D, Parra DC, Pathikonda S, Kurilova S, Cili A. Therapeutic Values of Exosomes in Cosmetics, Skin Care, Tissue Regeneration, and Dermatological Diseases. *Cosmetics.* 2023; 10(2):65. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10020065>
20. Kim JY, Rhim WK, Yoo YI, Kim DS, Ko KW, Heo Y, dkk. Defined MSC exosome with high yield and purity to improve regenerative activity . *J Tissue Eng.* 2021;12:1-15. doi:10.1177/20
21. Khan AQ, Akhtar S, Prabhu KS, Zarif L, Khan R, Alam M, et al. Exosomes: Emerging Diagnostic and Therapeutic Targets in Cutaneous Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec;21(23):9264. doi: 10.3390/ijms21239264. PMID: 33291683; PMCID: PMC7730213.
22. Ha DH, Kim H-k, Lee J, Kwon HH, Park G-H, Yang SH, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells.* 2020 May;9(5):1157. doi: 10.3390/cells9051157. PMID: 32392899; PMCID: PMC7290908.
23. Wawrzyk-Bochenek I, Rahnema M, Stachura M, Wilczyński S, Wawrzyk A. Evaluation of the reduction of skin hyperpigmentation changes under the influence of a preparation containing kojic acid using hyperspectral imaging-preliminary study. *J Clin Med.* 2023 Apr 4;12(7):2710. doi: 10.3390/jcm12072710.

24. Zhu JW, Ni YJ, Tong XY, Guo X, Wu XP, Lu ZF. Tranexamic acid inhibits angiogenesis and melanogenesis in vitro by targeting VEGF receptors. *Int J Med Sci.* 2020;17(7):903-911. doi: 10.7150/ijms.44188.
25. Li J, Jiang S, Huang C, Yang X. Atraric acid ameliorates hyperpigmentation through the downregulation of the PKA/CREB/MITF signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 15;23(24):15952. doi: 10.3390/ijms232415952.
26. Cho BS, Lee J, Won Y, Duncan DI, Jin RC, Lee J, Kwon HH, Park GH, Yang SH, Park BC, Park KY, Youn J, Chae J, Jung M, Yi YW. Skin brightening efficacy of exosomes derived from human adipose tissue-derived stem/stromal cells: a prospective, split-face, randomized placebo-controlled study. *Cosmetics.* 2020;7(4):90. doi: 10.3390/cosmetics7040090.
27. Wang XY, Guan XH, Yu ZP, Wu J, Huang QM, Deng KY, Xin HB. Human amniotic stem cells-derived exosomal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Sep 10;12(1):501. doi: 10.1186/s13287-021-02570-9.
28. Thawabteh AM, Jibreen A, Karaman D, Thawabteh A, Karaman R. Skin Pigmentation Types, Causes and Treatment—A Review. *Molecules.* 2023 Jun 18;28(12):4839. doi: 10.3390/molecules28124839.
29. Kim SH, Lee J, Jung J, Kim GH, Yun CY, Jung SH, et al. Interruption of p38MAPK-MSK1-CREB-MITF-M pathway to prevent hyperpigmentation in the skin. *Int J Biol Sci.* 2024;20(5):1688-1704. doi: 10.7150/ijbs.93120.
30. Yardman-Frank JM, Fisher DE. Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells. *Exp Dermatol.* 2020 Dec 15. doi: 10.1111/exd.14260.
31. Gangwar V, Garg A, Lomora K, Korla K, Bhat SS, Rao RP, et al. Immunomodulatory Effects of a Concoction of Natural Bioactive Compounds—Mechanistic Insights. *Biomedicines.* 2021;9(11):1522. doi: 10.3390/biomedicines9111522.
32. Cavinato M, Waltenberger B, Baraldo G, Grade CVC, Stuppner H, Jansen-Dürr P. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced

- photoaging. *Biogerontology*. 2017 Jul 12;18(4):499-516. doi:10.1007/s10522-017-9715
33. Jaenen V, Fraguas S, Bijmens K, Heleven M, Artois T, et al. Reactive oxygen species rescue regeneration after silencing the MAPK–ERK signaling pathway in *Schmidtea mediterranea*. *Sci Rep*. 2021;11:881. doi: 10.1038/s41598-020-79588-1.
 34. Alto NM, Orth K. Subversion of cell signaling by pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Sep;4(9). doi: 10.1101/cshperspect.a006114.
 35. Xu D, Zhao M. Photoaging induced by long-term exposure to UV irradiation and amelioration by Skipjack tuna skin hydrolysates: Targeting inhibition of MAPK and NF- κ B signaling hyperactivation. *J Funct Foods*. 2022;105281. doi: 10.1016/j.jff.2022.105281.
 36. Wölfle U, Seelinger G, Bauer G, Meinke MC, Lademann J, Schempp CM. Reactive molecule species and antioxidative mechanisms in normal skin and skin aging. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014; doi: 10.1159/000360092.
 37. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015;31:65-74. doi: 10.1111/phpp.12179.
 38. Pan CQ, Sudol M, Sheetz M, Low BC. Modularity and functional plasticity of scaffold proteins as placemakers in cell signaling. *Cell Signal*. 2012;24(9):2020-2031. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.06.006.
 39. Park S, Han N, Lee J, Lee JN, An S, Bae S. Anti-Melanogenic Effects of *Lilium lancifolium* Root Extract via Downregulation of PKA/CREB and MAPK/CREB Signaling Pathways in B16F10 Cells. *Plants*. 2023;12(21):3666. doi: 10.3390/plants12213666.
 40. An X, Lv J, Wang F. Pterostilbene inhibits melanogenesis, melanocyte dendricity and melanosome transport through cAMP/PKA/CREB pathway. *Eur J Pharmacol*. 2022;932:175231. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175231.
 41. Mohapatra T, Dixit M. IQ Motif Containing GTPase Activating Proteins (IQGAPs), A-Kinase Anchoring Proteins (AKAPs) and Kinase Suppressor of Ras Proteins (KSRs) in Scaffolding Oncogenic Pathways and Their

- Therapeutic Potential. *ACS Omega*. 2022;7(45837-45848). doi: 10.1021/acsomega.2c05505.
42. Tao J, Malbon CC. G-protein-coupled receptor-associated A-kinase anchoring proteins AKAP5 and AKAP12: differential signaling to MAPK and GPCR recycling. *J Mol Signal*. 2008;3:19. doi:10.1186/1750-2187-3-19.
43. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Apr;16 Suppl 2. doi: 10.1517/14728222.2011.639361
44. Aliev G, Obrenovich ME, Tabrez S, Jabir NR, Reddy VP, Li Y, et al. Link between cancer and Alzheimer disease via oxidative stress induced by nitric oxide-dependent mitochondrial DNA overproliferation and deletion. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:962984. doi: 10.1155/2013/962984.
45. Smith FD, Langeberg LK, Scott JD. Plugging PKA into ERK scaffolds. *Cell Cycle*. 2011 Mar 1;10(5):731-2. doi: 10.4161/cc.10.5.14902.
46. Wild AR, Dell'Acqua ML. Potential for therapeutic targeting of AKAP signaling complexes in nervous system disorders. *Pharmacol Ther*. 2018 May;185:99-121. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.12.004. PMID: PMC5899024.
47. Byrne DP, Omar MH, Kennedy EJ, Evers PA, Scott JD. Biochemical Analysis of AKAP-anchored PKA Signaling Complexes. *Methods Mol Biol*. 2022;2483:297-317. doi: 10.1007/978-1-0716-2245-2_19. PMID: PMC9518671. PMID: 35286684.
48. Gelmi MC, Houtzagers LE, Strub T, Krossa I, Jager MJ. MITF in Normal Melanocytes, Cutaneous and Uveal Melanoma: A Delicate Balance. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun;23(11):6001. doi: 10.3390/ijms23116001. PMID: PMC9181002. PMID: 35682684.
49. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul;17(7):1144. doi: 10.3390/ijms17071144. PMID: PMC4964517. PMID: 27428965.

50. Meyer RD, Srinivasan S, Singh AJ, Mahoney JE, Rezazadeh Gharahassanlou K, Rahimi N. PEST Motif Serine and Tyrosine Phosphorylation Controls Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Stability and Downregulation. *Mol Cell Biol.* 2011 May;31(10):2010-25. doi:10.1128/MCB.01006-10.
51. Rosner M, Horer S, Feichtinger M, Hengstschläger M. Multipotent fetal stem cells in reproductive biology research. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14:157. doi: 10.1186/s13287-023-03379-4. PMCID: PMC10249329. PMID: 37287077.
52. He J, Teng X. Injection of Sca-1⁺/CD45⁺/CD31⁺ mouse bone mesenchymal stromal-like cells improves cardiac function in a mouse myocardial infarct model. *Differentiation.* 2013;86(1-2):57-64. doi: 10.1016/j.diff.2013.07.002.
53. Li Z, Hu X, Zhong JF. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application. *Stem Cells Int.* 2019;2019:8106818. doi: 10.1155/2019/8106818. PMCID: PMC6431372. PMID: 30956675.
54. Shi Y, Zhou J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): origin, immune regulation, and clinical applications. *Cell Mol Immunol.* 2023;20:555-557. doi: 10.1038/s41423-023-01034-9.
55. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77:2771–2794. doi: 10.1007/s00018-020-03454-6.
56. Almeria C, Weiss R, Roy M, Tripisciano C, Kasper C, Weber V, Egger D. Hypoxia conditioned mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles induce increased vascular tube formation in vitro. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:292. doi: 10.3389/fbioe.2019.00292.
57. Marof F, Alexandrovna KI, Margiana R, Bahramali M, Suksatan W, et al . MSCs and their exosomes: a rapidly evolving approach in the context of cutaneous wounds therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12:597. doi: 10.1186/s13287-021-02662-6.
58. Xiong M, Zhang Q, Hu W, Zhao C, Lv W, Yi Y, Wang Y, Tang H, Wu M, Wu Y. The novel mechanisms and applications of exosomes in dermatology and cutaneous medical aesthetics. *Pharmacol Res.* 2021;165:105490. doi:

- 10.1016/j.phrs.2021.105490.
59. Yang GH, Lee YB, Kang D, et al. Overcome the barriers of the skin: exosome therapy. *Biomater Res.* 2021;25:22. doi: 10.1186/s40824-021-00224-8.
 60. Rahman MS, Kim YS. PINK1–PRKN mitophagy suppression by mangiferin promotes a brown-fat-phenotype via PKA-p38 MAPK signalling in murine C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *Metabolism.* 2020;154:228. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154228.
 61. Lv J, Yang S, Lv M, Lv J, Sui Y, Guo S. Protective roles of mesenchymal stem cells on skin photoaging: A narrative review. *Tissue and Cell.* 2022. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101746>.
 62. He GH, Ma YX, Dong M, Chen S, Wang YC, Gao X, Wu B, Wang J, Wang JH. Mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit the VEGF-A expression in human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose. *Int J Ophthalmol.* 2021;14(12):1820-1827. doi: 10.18240/ijo.2021.12.03.
 63. You YJ, Wu PY, Liu YJ, Hou CW, Wu CS, Wen KC, Lin CY, Chiang HM. Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin. *Antioxidants.* 2019;8(7):207. doi:10.3390/antiox8070207.
 64. Personelle J, De Campos S, De Oliveira Ruiz R, Queiroz Ribeiro G. Injection of all-trans retinoic acid for treatment of thin wrinkles. *Aesth Plast Surg.* 1997;21:196-204. doi:10.1007/s002660050115.
 65. Shao X, Zhang M, Chen Y, Sun S, Yang S, Li Q. Exosome-mediated delivery of superoxide dismutase for anti-aging studies in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Pharm.* 2023;641:123090. doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.123090.
 66. Duan Y, Yu C, Kuang W, Li J, Qiu S, Ni S, et al. Mesenchymal stem cell exosomes inhibit nucleus pulposus cell apoptosis via the miR-125b-5p/TRAF6/NF- κ B pathway axis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2023;55(12):1938-49. doi: 10.3724/abbs.2023241

67. Liu Y, Xue L, Gao H, Chang L, Yu X, Zhu Z, et al. Exosomal miRNA derived from keratinocytes regulates pigmentation in melanocytes. *J Dermatol Sci.* 2019;93(3):159-167. doi:10.1016/j.jdermsci.2019.02.001.
68. Tian R, Wu B, Fu C, Guo K. miR-137 prevents inflammatory response, oxidative stress, neuronal injury and cognitive impairment via blockade of Src-mediated MAPK signaling pathway in ischemic stroke. *Aging (Albany NY).* 2020;12(11):10873-95. doi: 10.18632/aging.103301. PMID: 32496209. PMCID: PMC7346022.
69. Kalaimani L, Devarajan B, Namperumalsamy VP, Veerappan M, Daniels JT, Chidambaranathan GP. Hsa-miR-143-3p inhibits Wnt- β -catenin and MAPK signaling in human corneal epithelial stem cells. *Sci Rep.* 2022;12:11432. doi:10.1038/s41598-022-15514-0.
70. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *J Inflamm (Lond).* 2010;7:21. doi:10.1186/1476-9255-7-21
71. Wu S, Sun S, Fu W, Yang Z, Yao H, Zhang Z. The role and prospects of mesenchymal stem cells in skin repair and regeneration. *Biomedicines.* 2024 Apr;12(4):743. doi: 10.3390/biomedicines12040743. PMID: 38672102. PMCID: PMC11048165.
72. Wang Y, Shen X, Song S, Chen Y, Wang Y, Liao J, Chen N, Zeng L. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and skin photoaging: From basic research to practical application. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2023 Aug 21. Available from: <https://doi.org/10.1111/phpp.12910>