

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP KADAR *MATRIX METALLOPROTEINASE-1* (MMP-1) DAN *MALODEALDEHID* (MDA)**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UV-B)**

**TESIS**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



**Magister Ilmu Biomedik**

**Jessica Angelina**

**MBK2220010316**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG 2024**

**TESIS**

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP KADAR *MATRIX METALLOPROTEINASE-1* (MMP-1) DAN *MALODEALDEHID* (MDA)**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UV-B)**

Diajukan oleh:

Jessica Angelina

MBK2220010316

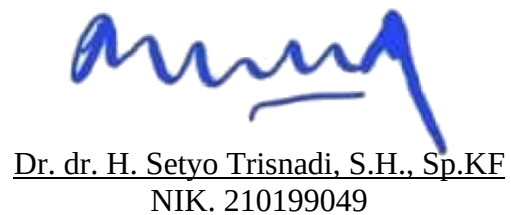
Telah disetujui oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,



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



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF  
NIK. 210199049

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 maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 15 Oktober 2024

**(Jessica Angelina)**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP KADAR *MATRIX METALLOPROTEINASE-1* (MMP-1) DAN *MALODEALDEHID* (MDA) (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UV-B)”**.

Pada penyusunan tesis ini penyusun mendapat pengarahan dan bimbingan, untuk itu penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Prof Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H. Sp.KF selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan dorongan, semangat kepada penyusun selama penyusunan tesis ini.
4. Prof. Dr. dr. Agung Putra M.Si., selaku pembimbing I yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan kepada penyusun selama penyusunan tesis ini.

5. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF. selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan kepada penyusun selama penyusunan tesis ini.
6. Para penguji Prof.Dr.dr. Dedi Hermansyah, Sp.B(K)Onk, Dr.dr. Eko Setiawan, SpB, dan Prof.Dr.Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk hadir sebagai penguji pada sidang thesis ini. Terima kasih atas masukan dan perbaikan pada thesis ini.
7. Para dosen pengajar dan rekan-rekan staf Magister Ilmu Biomedik yang tidak dapat disebutkan satu-satu yang telah memberikan doa, masukan dan bantuan kepada penyusun.
8. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga tesis ini dapat diselesaikan.
9. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Tak ada gading yang tak retak, kesempurnaan hanyalah milik Tuhan Yang Maha Esa. Manusia tidak luput dari kesalahan, untuk itu penyusun berharap dengan segala kekurangan dalam penulisan tesis ini, semoga tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Program Pendidikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Tuhan Yang Maha Esa senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatNya kepada kita semua, Amin.

Semarang, 15 Oktober 2024

**(Jessica Angelina)**

## DAFTAR ISI

|                                                                                                      |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| HALAMAN JUDUL.....                                                                                   | i    |
| HALAMAN PENNGESAHAN.....                                                                             | ii   |
| PERNYATAAN.....                                                                                      | iii  |
| RIWAYAT HIDUP.....                                                                                   | iv   |
| KATA PENGANTAR .....                                                                                 | v    |
| DAFTAR ISI.....                                                                                      | vii  |
| DAFTAR SINGKATAN .....                                                                               | x    |
| DAFTAR TABEL.....                                                                                    | xii  |
| DAFTAR GAMBAR .....                                                                                  | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN.....                                                                                 | xiv  |
| BAB I PENDAHULUAN.....                                                                               | 1    |
| 1.1. Latar Belakang .....                                                                            | 1    |
| 1.2. Rumusan Masalah .....                                                                           | 3    |
| 1.3. Tujuan Penelitian .....                                                                         | 4    |
| 1.3.1. Tujuan Umum.....                                                                              | 4    |
| 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.....                                                                         | 8    |
| 2.1. <i>Matrixmetalloproteinase-1</i> (MMP-1) .....                                                  | 8    |
| 2.1.1. Definisi MMP-1 .....                                                                          | 8    |
| 2.1.2. Peran dan Mekanisme Seluler MMP-1 dalam Kolagen Loss....                                      | 9    |
| 2.2. <i>Malondyaldehyde</i> (MDA) .....                                                              | 12   |
| 2.2.1. Definisi .....                                                                                | 12   |
| 2.2.2. Aktivasi dan Mekanisme Seluler MDA pada Kulit yang<br>Terpapar UVB dan Penurunan Kolagen..... | 13   |
| 2.3. MSCs.....                                                                                       | 15   |

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.1. Fungsi .....                                                                    | 16        |
| 2.3.2. Mobilisasi MSC.....                                                             | 17        |
| 2.3.3. Konsep <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSC .....                            | 18        |
| 2.3.4. Induksi <i>Small Molecule</i> dan <i>Exosome</i> MSC .....                      | 20        |
| 2.4. Ultraviolet B (UVB).....                                                          | 21        |
| 2.4.1. <i>Photoaging</i> .....                                                         | 22        |
| 2.4.2. Kolagen .....                                                                   | 23        |
| 2.5. Pengaruh EH-MSCs terhadap Kadar MMP-1 dan MDA pada Tikus<br>yang dipapar UVB..... | 27        |
| <b>BAB III KERANGKA TEORI .....</b>                                                    | <b>29</b> |
| 3.1. Kerangka Teori.....                                                               | 29        |
| 3.2. Kerangka Konsep .....                                                             | 33        |
| 3.3. Hipotesis.....                                                                    | 33        |
| <b>BAB IV METODE PENELITIAN .....</b>                                                  | <b>34</b> |
| 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian .....                                   | 34        |
| 4.2. Variabel penelitian dan definisi operasional .....                                | 35        |
| 4.2.1. Variabel penelitian .....                                                       | 35        |
| 4.2.2. Definisi Operasional Variabel .....                                             | 36        |
| 4.3. Subyek Penelitian dan Sample Penelitian .....                                     | 38        |
| 4.3.1. Obyek penelitian.....                                                           | 38        |
| 4.3.2. Sampel Penelitian.....                                                          | 39        |
| 4.3.3. Besar Sampel .....                                                              | 39        |
| 4.4. Alat dan Bahan .....                                                              | 40        |
| 4.4.1. Alat penelitian .....                                                           | 40        |
| 4.4.2. Bahan penelitian .....                                                          | 41        |
| 4.5. Cara Penelitian .....                                                             | 42        |
| 4.5.1. <i>Ethical clearance</i> .....                                                  | 42        |
| 4.5.2. Pembuatan Eksosom.....                                                          | 42        |
| 4.5.3. Penyinaran UV-B pada subyek penelitian.....                                     | 42        |
| 4.5.4. Validasi Hewan Coba .....                                                       | 43        |
| 4.5.5. Analisis kadar MMP-3 dan MDA menggunakan ELISA .....                            | 44        |

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6. Tempat dan Waktu Penelitian .....                   | 46        |
| 4.7. Analisa Data .....                                  | 46        |
| 4.8. Alur Penelitian .....                               | 47        |
| <b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>                   | <b>48</b> |
| 5.1. Hasil Penelitian .....                              | 49        |
| 5.1.1. Hasil Validasi E-MSCs .....                       | 49        |
| 5.1.2. Efek Pemberian EH-MSCs terhadap Kadar MDA.....    | 51        |
| 5.1.3. Efek Pemberian EH-MSCs terhadap Kadar MMP-1 ..... | 55        |
| 5.2. Pembahasan.....                                     | 57        |
| <b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>                 | <b>61</b> |
| 6.1. Kesimpulan .....                                    | 61        |
| 6.2. Saran.....                                          | 61        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>                              | <b>62</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>                                     | <b>71</b> |





## DAFTAR SINGKATAN

|        |                                                           |
|--------|-----------------------------------------------------------|
| AP-1   | : <i>Activating Protein 1</i>                             |
| ARE    | : <i>Antioxidant Respond Element</i>                      |
| CAT    | : <i>Catalase</i>                                         |
| DAMP   | : <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>              |
| DNA    | : <i>Deoxyribonucleic Acid</i>                            |
| ECM    | : <i>Extracellular Matrix</i>                             |
| EH-MSC | : <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>            |
| EPO    | : <i>Erythropoietin</i>                                   |
| ERKs   | : <i>Extracellular Single-Regulated Kinases</i>           |
| GCSF   | : <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>            |
| GM-CSF | : <i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i> |
| GPX    | : <i>Glutathione Peroxidase</i>                           |
| H-MSC  | : <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>                    |
| IL     | : <i>Interleukin</i>                                      |
| JNK    | : <i>c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase</i>             |
| Keap-1 | : <i>Kelch like ECH Associated Protein 1</i>              |
| MAPK   | : <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>                 |
| MDA    | : <i>Malondialdehyde</i>                                  |
| MMPs   | : <i>Matrix Metalloproteinases</i>                        |
| NF-κB  | : <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>                           |
| PI3K   | : <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>                        |
| PIGF   | : <i>Placental Growth Factor</i>                          |
| ROS    | : <i>Reactive Oxidative Species</i>                       |
| SASP   | : <i>Senescence-associated secretory phenotype</i>        |
| SCF    | : <i>Stem Cell Factor</i>                                 |
| SDF-1  | : <i>Stromal-derived factor-1</i>                         |
| SIRT   | : <i>Sirtuin</i>                                          |
| SOD    | : <i>Superoxyde Dismutase</i>                             |
| SPF    | : <i>Sun Protection Factor</i>                            |

|             |                                                        |
|-------------|--------------------------------------------------------|
| TGF $\beta$ | : <i>Transformin Growth Factor- <math>\beta</math></i> |
| TIMP        | : <i>Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase</i>  |
| UV          | : <i>Ultraviolet</i>                                   |
| VEGF        | : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>            |



## DAFTAR TABEL

|            |                                                                                                         |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 1.1. | Originalitas Penelitian.....                                                                            | 6  |
| Tabel 2.1. | Perbandingan perubahan histologis dan klinis yang terbukti pada penuaan kronologis dan Photoaging ..... | 22 |
| Tabel 5.1. | Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Kadar MDA dan MMP-1.....                    | 52 |
| Tabel 5.2. | Perbedaan Kadar MDA Antar 2 Kelompok.....                                                               | 54 |
| Tabel 5.3. | Perbedaan Kadar MMP-1 Antar 2 Kelompok .....                                                            | 56 |



## DAFTAR GAMBAR

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gambar 2.1. | Peran MMPs dalam Proses Penurunan Kolagen.....                                                                                                                                                                                                                        | 10 |
| Gambar 2.2. | Jalur Pensinyalan Utama <i>Collagen Loss</i> dan <i>Photoaging</i> .....                                                                                                                                                                                              | 15 |
| Gambar 2.3. | Kemampuan Diferensiasi dari MSC .....                                                                                                                                                                                                                                 | 16 |
| Gambar 2.4. | Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC .....                                                                                                                                                                                                                           | 20 |
| Gambar 3.1. | Kerangka Teori .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 32 |
| Gambar 3.2. | Kerangka Konsep .....                                                                                                                                                                                                                                                 | 33 |
| Gambar 4.1. | Rancangan Penelitian .....                                                                                                                                                                                                                                            | 34 |
| Gambar 4.2. | Alur Penelitian .....                                                                                                                                                                                                                                                 | 47 |
| Gambar 5.1. | Tidak terdapat kemerahan dan kerutan (A) , Tampak memerah dan kerutan (B), <i>Masson Thrichrome</i> dengan warna biru yang menandakan adanya produksi kolagen (C), Kulit tikus UVB dengan menunjukkan warna merah yang menandakan ekspresi kolagen terhambat (D)..... | 49 |
| Gambar 5.2. | (A) MSCs passage 4 konfluensi 80% (Perbesaran 40x), (B) Gambaran desposisi kalium dengan pewarnaan Alizarin Red (perbesaran 400x), dan (C) Gambaran desposisi lemak dengan pewarnaan Oil Red O (perbesaran 400x). ....                                                | 50 |
| Gambar 5.3. | Ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31 pada MSCs .....                                                                                                                                                                                                                   | 51 |
| Gambar 5.4. | Validasi Eksosom.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 51 |
| Gambar 5.5. | Ekspresi Relatif mRNA MDA, tabel ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model $\pm$ SD .....                                                                                                                                                                 | 55 |
| Gambar 5.6. | Ekspresi Relatif mRNA MMP-1, tabel ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model $\pm$ SD .....                                                                                                                                                               | 57 |

## DAFTAR LAMPIRAN

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i> ..... | 71 |
| Lampiran 2. Statistika .....               | 72 |
| Lampiran 3. Dokumentasi penelitian .....   | 76 |



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Paparan radiasi ultraviolet (UV) dari matahari merupakan faktor lingkungan yang terlibat dalam proses penuaan dan masalah kulit. Radiasi UV meningkatkan risiko kerusakan kulit jangka panjang, termasuk penuaan, penurunan daya tahan tubuh, karsinogenesis, dan kerusakan pada protein kolagen dan elastin kulit<sup>1</sup>. Radiasi UV merangsang pembentukan radikal *reactive oxygen species* (ROS) sebagai perantara sekunder yang mengaktifkan jalur *mitogen activated protein kinase* (MAPK) sehingga menyebabkan kerusakan yang persisten<sup>2</sup>. Mekanisme tersebut ditandai dengan peningkatan ekspresi *activating protein-1* (AP-1) dan *matrix metalloproteinases* (MMPs), yang berkontribusi pada proses penuaan kulit<sup>3</sup>. Radiasi UV juga dapat menurunkan ekspresi inhibitor MMPs, yaitu *tissue inhibitors of matrix metalloproteinase* (TIMP), yang bertanggung jawab atas degradasi kolagen. Peningkatan kadar *malondialdehyde* (MDA) juga berkorelasi dengan kerusakan jaringan dan inflamasi akibat ROS hasil radiasi UV<sup>4</sup>. Paparan UVB dapat merusak struktur kulit lebih dalam, termasuk jaringan kolagen<sup>3</sup>.

*Hyaluronic Acid* (HA) memainkan peran penting dalam menjaga kesehatan kulit dan mencegah kehilangan kolagen. Dengan menjaga hidrasi, mendukung struktur kulit, melindungi terhadap kerusakan, dan memperbaiki jaringan, HA berkontribusi signifikan terhadap kesehatan dan elastisitas

kulit. HA sering digunakan untuk mencegah hilangnya kolagen akibat paparan UVB namun karena HA secara alami terurai dalam tubuh, terapi ini hanya memberikan efek sementara dan diperlukan aplikasi berulang, serta terapi ini lebih efektif dalam hidrasi kulit lapisan atas<sup>4</sup>. Dengan kata lain, HA tidak dapat menekan inflamasi dan radikal bebas akibat radiasi yang dipaparkan oleh UVB. Untuk mempertahankan efek manfaat dari HA, diperlukan penggunaan yang berkelanjutan. Sehingga pada penelitian ini, ingin menggunakan eksosom stem sel mesenkimal sebagai kemungkinan opsi terapi yang lebih efektif.

Peningkatan insidensi gangguan kulit yang disebabkan oleh paparan sinar UV terjadi setiap tahun, sejalan dengan penipisan lapisan ozon<sup>5</sup>. Temuan dari studi di Australia menunjukkan bahwa tingkat gangguan kulit yang terkait dengan sinar UV mencapai 72% pada laki-laki dan 47% pada perempuan yang berusia kurang dari 30 tahun<sup>6</sup>. Studi epidemiologi pada populasi Amerika Utara dengan tipe kulit Fitzpatrick I-III menunjukkan tingkat insidensi kerusakan kulit yang lebih tinggi, mencapai 80-90%<sup>7</sup>.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa UVB dapat merangsang fibroblas dalam dermis untuk meningkatkan ekspresi MMP-1<sup>8</sup>. Paparan UVB memicu aktivasi protein p53 dan c-Jun, yang berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi MMP-1<sup>8</sup>. Sisi lain, paparan UVB juga dapat menghasilkan MDA sebagai produk sampingan dari peroksidasi lipid<sup>9</sup>. MDA merupakan suatu indikator dari stres oksidatif dan kerusakan seluler yang disebabkan oleh radikal bebas akibat paparan sinar UVB<sup>10</sup>.



Penelitian terdahulu telah mengkaji peran penting sitokin dan *growth factor*, seperti *interleukin-10* (IL-10) dan *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) stres oksidatif akibat UVB<sup>11</sup>. Sitokin dan *growth factor* tersebut memiliki dampak positif terhadap penurunan kadar MMP-1 dan pengurangan stres oksidatif<sup>3</sup>. Penelitian lain juga melaporkan bahwa sitokin dan *growth factor* tersebut juga terkandung dalam eksosom yang diproduksi oleh *mesenchymal stem cell* yang diprekondisi hipoksia (H-MSCs)<sup>12</sup>. Selain itu, penelitian lain juga menunjukkan bahwa eksosom MSC mengandung mikroRNA seperti miR-21 yang dapat mengatur jalur inflamasi seperti IL-6 dan TNF-alpha yang diproduksi berlebih pada inflamasi berkepanjangan<sup>13</sup>. Temuan ini menggambarkan potensi eksosom MSC sebagai agen protektif melalui pengaturan kadar MMP-1 dan MDA, namun demikian, belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh eksosom MSC terhadap kadar MMP1 dan MDA pada tikus yang terpapar UV-B.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh H-MSCs terhadap kadar MMP1 dan MDA pada kulit tikus yang terpapar UV-B.

## 1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian EH-MSC terhadap kadar MMP-1 dan MDA pada tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UVB?



### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh pemberian EH-MSC terhadap kadar MMP-1 dan MDA yang diinduksi sinar UVB pada tikus galur Wistar.

#### **1.3.2. Tujuan Khusus**

1. Membuktikan perbedaan kadar MMP-1 pada tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UVB yang diberikan injeksi EH-MSC 200 uL dan 300 uL dibandingkan kontrol.
2. Membuktikan perbedaan kadar MDA pada tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UVB yang diberikan injeksi EH-MSC 200 uL dan 300 uL dibandingkan kontrol.

### **1.4. Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1. Manfaat Teoritis**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai peran pemberian EH-MSC terhadap kadar MMP-1 dan MDA pada tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UVB.

#### **1.4.2. Manfaat Praktis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi edukasi bagi masyarakat mengenai manfaat EH-MSC pada tubuh. Bagi klinisi, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi masukan mengenai

terapi menggunakan EH-MSc sebagai antiinflamatori pada individu dengan paparan sinar UVB tinggi.

### 1.5. Originalitas Penelitian

Hasil pencarian sumber pustaka menunjukkan saat ini belum ada secara molekuler tentang penelitian yang menilai pengaruh pemberian EH-MSc terhadap kadar MMP-1 dan MDA yang diinduksi sinar UVB pada tikus galur Wistar. Beberapa penelitian yang berhubungan dengan penelitian ini diantaranya:



Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

| No | Peneliti                         | Judul                                                                                                                               | Metode                       | Hasil Penelitian                                                                                          |
|----|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Gao et al., 2021 <sup>14</sup>   | <i>Exosome Derived from ADSCs Attenuates Ultraviolet B-mediated Photoaging in Human Dermal Fibroblasts</i>                          | <i>Experimental in vitro</i> | EH-MSC dapat efektif mengaktifkan jalur TGF- $\beta$ /Smad untuk meningkatkan ekspresi prekollagen tipe I |
| 2  | Hwang et al., 2014 <sup>15</sup> | <i>Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice</i>                                            | Experimental In vivo         | Pemberian eksposur UVB selama 3 minggu menurunkan densitas kolagen                                        |
| 3  | Yan et al., 2023 <sup>16</sup>   | <i>Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome miR-29b-3p alleviates UV irradiation-induced photoaging in skin fibroblast</i> | <i>Experimental in vitro</i> | BMSCs-exo-miR-29b-3p berperan dalam meningkatkan fungsi peremajaan kulit akibat paparan sinar matahari    |
| 4  | Putra et al., 2020 <sup>17</sup> | <i>MSC-released TGF-<math>\beta</math> regulate <math>\alpha</math>-SMA expression of myofibroblast during wound healing</i>        | <i>Experimental in vivo</i>  | TGF beta yang dilepas MSC meningkatkan ekspresi Alpha-SMA pada penyembuhan kulit                          |
| 5  | Guan et al., 2017 <sup>18</sup>  | <i>Topical application of ST266 reduces UV-induced skin damage</i>                                                                  | <i>Experimental in vivo</i>  | ST266 yang berasal dari sel amnion dapat menurunkan inflamasi dan kerusakan DNA akibat UVB                |

Penelitian sebelumnya telah melaporkan peran eksosom MSC pada photoaging melalui *pathway* TGF- $\beta$ /Smad<sup>14,15</sup>. Studi lain mengungkapkan peran miR-29b-3p dalam eksosom MSC sumsum tulang meningkatkan

peremajaan kulit dengan menekan MMPs<sup>16</sup>. Penelitian lain juga melaporkan MSCs mampu meningkatkan eksosom dan TGFb untuk memperbaiki kolagen pada *myofibroblast*<sup>17</sup>. Penelitian in vivo pada tikus Wistar juga mengungkap peran eksosom amnion dalam menurunkan inflamasi dan kerusakan DNA akibat UVB<sup>18</sup>. Studi di atas berbeda dengan penelitian yang akan dilakukan, yang mana berfokus pada kemampuan eksosom MSC umbilical cord hipoksia dalam memperbaiki kulit yang terpapar UVB melalui sudut pandang analisis parameter kadar MMP-1 dan MDA.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. *Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1)*

##### 2.1.1. Definisi MMP-1

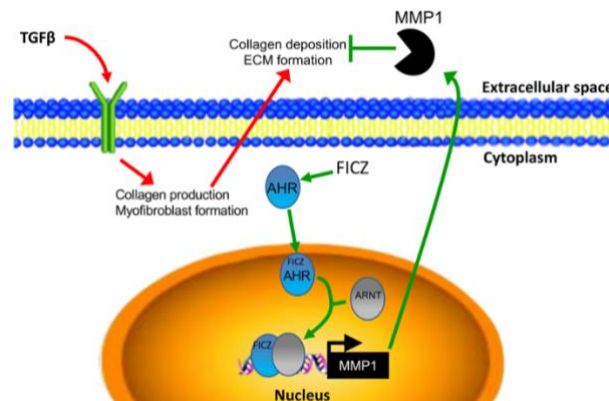
*Matrix metalloproteinases (MMPs)* adalah endopeptidase yang mengandung zinc dengan berbagai spesifisitas substrat dan terikat dengan membran yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi berbagai komponen protein *extracellular matrix (ECM)*<sup>19-21</sup>. Berdasarkan struktur dan spesifisitas substratnya, MMPs dapat dikategorikan ke dalam lima subkelompok utama, yaitu (1) kolagenase (MMP-1, MMP-8 dan MMP-13); (2) gelatinase (MMP-2 dan MMP-9); (3) stromelisin (MMP-3, MMP-10 dan MMP-11); (4) matrilisin (MMP-7 dan MMP-26); dan (5) MMP tipe membran (MT) (MMP-14, MMP-15, dan MMP-16)<sup>22</sup>. Endopeptidase ini disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dermal sebagai respons terhadap berbagai rangsangan seperti stres oksidatif, radiasi *ultraviolet*, dan sitokin<sup>23</sup>.

Hingga saat ini, setidaknya ada 28 jenis MMPs yang berbeda telah diidentifikasi dan memainkan peran penting dalam berbagai proses patofisiologis termasuk penyembuhan luka, pertumbuhan tulang dan *remodelling*, arthritis, inflamasi, angiogenesis, kanker, dan *photoaging*<sup>24,25</sup>. Beberapa penelitian terdahulu mengungkapkan bahwa radiasi UV meningkatkan setidaknya tiga MMPs yang

berbeda pada kulit manusia secara *in vivo*, yaitu *interstitial collagenase* (MMP-1), stromelysin-1 (MMP-3), dan 92 -kD gelatinase (MMP-9)<sup>26-28</sup>. Ketiga faktor tersebut secara kuat diinduksi oleh *actovating protein 1* (AP1) yang secara cepat diinduksi dan diaktifkan oleh radiasi UV pada kulit manusia secara *in vivo* serta memiliki kapasitas untuk mendegradasi sebagian besar protein yang menyusun ECM dermal<sup>29-31</sup>.

### 2.1.2. Peran dan Mekanisme Seluler MMP-1 dalam Kolagen Loss

Kolagen loss merupakan penurunan kadar kolagen pada kulit yang disebabkan oleh paparan UVA dan UVB yang dapat menginduksi stres oksidatif pada kulit manusia dan menyebabkan kerusakan genetik temporal dan persisten, peningkatan regulasi aktivitas AP1, dan peningkatan ekspresi MMP<sup>32-35</sup>. Dalam proses *penurunan kadar kolagen*, ROS intraseluler berlebih yang diinduksi UV mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) dan *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) yang berpuncak pada regulasi transkripsi MMP, dan menghasilkan degradasi kolagen dan elastin, yang berlanjut ke *photoaging* (Gambar 1).



**Gambar 2.1.** Peran MMPs dalam Proses Penurunan Kolagen<sup>35</sup>

Menariknya, di antara MMPs yang diekspresikan pada kulit manusia normal, hanya tiga yang diinduksi secara signifikan sebagai respons terhadap penyinaran *ultraviolet* (UV), yaitu MMP-1 (kolagenase), MMP-3 (stromelysin-1), dan MMP-9 (92kD gelatinase). Keratinosit epidermis dan fibroblas dermal mensekresi kolagenase MMP-1 yang mendegradasi kolagen fibrilar tipe I dan III menjadi fragmen-fragmen spesifik di dalam triple heliks sentral. Gelatinase MMP-9 kemudian menghidrolisis fragmen ini yang pada akhirnya merusak fungsi dermis kaya kolagen<sup>36</sup> Iradiasi UV menginduksi peningkatan sintesis dan ekspresi gen MMP-1 oleh fibroblast dermal, yang dirangsang oleh pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) berlebih, dan memainkan peran penting dalam penurunan kolagen. Iradiasi UV menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ), anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dan radikal hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ) yang mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)<sup>37</sup>.



*Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) adalah keluarga dari kinase Ser/Thr yang diarahkan oleh prolin yang terdiri dari *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) yang menstimulasi ekspresi c-Fos, p38 dan c-Jun *NH<sub>2</sub>-terminal kinase* (JNK) yang menstimulasi ekspresi c-Jun<sup>37</sup>. Kombinasi c-Jun dengan c-Fos membentuk faktor transkripsi AP-1 yang memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 dan mengakibatkan degradasi kolagen<sup>37</sup>. Selain itu, AP-1 menghambat *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) yang merupakan pengatur utama produksi prokolagen tipe I pada kulit manusia sehingga menyebabkan penurunan sintesis prokolagen<sup>38,39</sup>. Selain AP-1, ROS juga menginduksi aktivasi transkripsi yang dimediasi NF- $\kappa$ B dan regulasi ekspresi gen MMP. Aktivitas NF- $\kappa$ B bertanggung jawab atas up-regulasi MMP-1 dan MMP-3 pada fibroblas dermal<sup>40,41</sup>. Aktivasi AP-1 yang diinduksi UV meningkatkan ekspresi gen MMP-1, MMP-3, dan MMP-9. Ketiga MMP tersebut mendegradasi sejumlah besar protein ECM, seperti kolagen tipe IV, V, IX, dan X, gelatin, fibrillin-1, fibronektin, laminin, dan proteoglikan. Fungsi utama MMP-3 adalah mengaktivasi pro-MMP seperti kolagenase, gelatinase B, dan matrilisin selama pergantian ECM. Produksi MMP-1 dan MMP-3 sangat penting untuk mengaktifkan sebagian pro-MMP-1<sup>42</sup>.



## 2.2. *Malondyaldehyde* (MDA)

### 2.2.1. Definisi

*Malondyaldehyde* (MDA) adalah senyawa organik dengan rumus nominal  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ . Ini adalah senyawa yang sangat reaktif yang terjadi secara alami dan merupakan penanda stres oksidatif<sup>43</sup>. MDA sebagian besar ada dalam bentuk enol, dan dalam pelarut organik, isomer cis lebih disukai, sedangkan dalam air, isomer trans lebih dominan<sup>44</sup>. MDA dihasilkan dari peroksidasi lipid asam lemak poliunsaturasi dan merupakan produk utama dalam sintesis tromboksan  $\text{A}_2$ <sup>45</sup>.

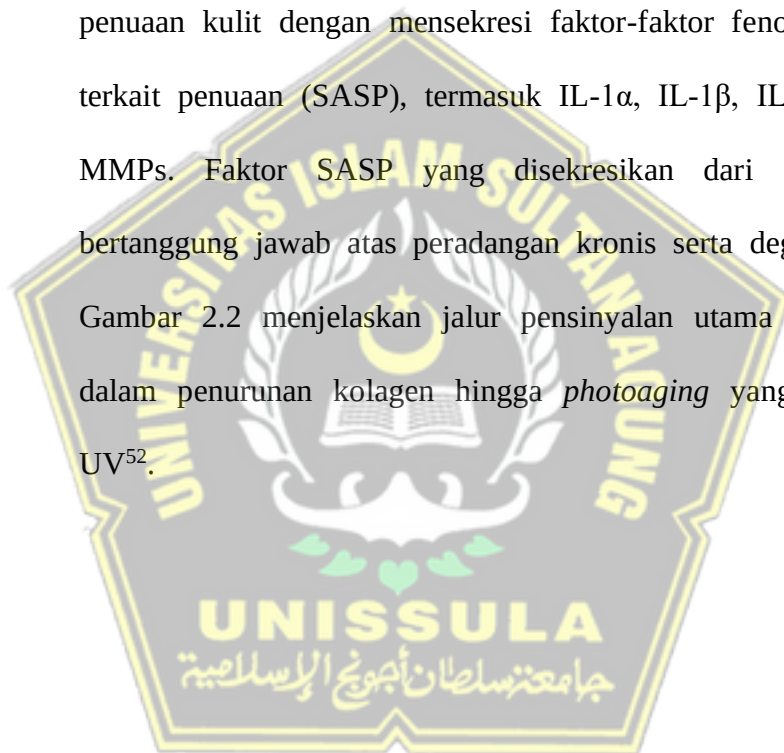
MDA digunakan sebagai biomarker stres oksidatif dalam banyak masalah kesehatan seperti kolagen loss, hiperpigmentasi, allergy, periodontitis dan kanker<sup>45-47</sup>. MDA bereaksi dengan deoksiasenosin dan deoksiguanosin dalam DNA dan dapat menyebabkan mutasi. Pada orang dewasa yang lebih tua, MDA telah dikaitkan dengan mortalitas akibat semua penyakit<sup>48</sup>. MDA diproduksi oleh lipid membran sebagai respons terhadap ROS dan dapat digunakan sebagai indikator untuk mengevaluasi tingkat kerusakan membran plasma sel<sup>48</sup>. MDA adalah salah satu produk akhir peroksidasi asam lemak poliunsaturasi dalam sel dan dapat menyebabkan kerusakan dan lisis protein pada sistem membran sel dan menyebabkan kematian sel kulit dalam kasus yang parah<sup>48</sup>.

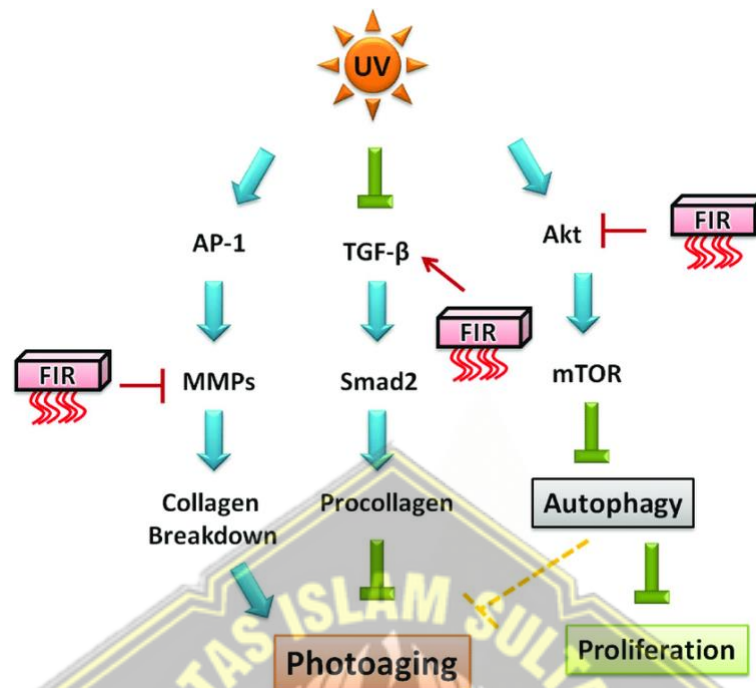
### 2.2.2. Aktivasi dan Mekanisme Seluler MDA pada Kulit yang Terpapar UVB dan Penurunan Kolagen

Peningkatan kadar MDA telah dilaporkan oleh berbagai penelitian defisiensi kolagen pada kulit<sup>49</sup>. MDA adalah dialdehid tiga karbon yang sangat reaktif yang dihasilkan sebagai produk samping dari peroksidasi asam lemak poliunsaturasi dan asam arakidonik<sup>49</sup>. MDA merupakan penanda stres oksidatif dan dapat bereaksi dengan deoksiasenosin dan deoksiguanosin dalam DNA yang dapat menyebabkan mutasi<sup>49</sup>.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa MDA berperan penting dalam defisiensi kolagen pada kulit yang terpapar sinar matahari dan berkontribusi pada kerusakan kulit<sup>49</sup>. Peran stres oksidatif dalam kelainan *collagen loss* kulit dapat diprediksi oleh temuan klinis kadar kolagen kulit yang abnormal pada beberapa penyakit kulit akibat UVB<sup>49</sup>. Paparan UVB pada kulit dapat menghasilkan peningkatan jumlah ROS, yang menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dan mekanisme pertahanan antioksidan, yang mengakibatkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan DNA dan produksi sitokin proinflamasi, yang dapat berkontribusi pada perkembangan *collagen loss*. Stres oksidatif tersebut yang memicu aktivasi jalur dan ekspresi MDA dalam kulit<sup>50</sup>.

Berbagai stresor termasuk radiasi UV dapat meningkatkan produksi MDA yang berdampak pada kerusakan DNA dan penghentian siklus sel melalui jalur p53/p21 sehingga melibatkan kaskade P38/MAPK dan jalur NF- $\kappa$ B<sup>51</sup>. Telah ditunjukkan bahwa kulit manusia yang terpapar sinar UV memiliki akumulasi sel tua yang sangat tinggi. Akumulasi fibroblas tua dapat mempercepat penuaan kulit dengan mensekresi faktor-faktor fenotipe sekretori terkait penuaan (SASP), termasuk IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, dan MMPs. Faktor SASP yang disekresikan dari fibroblas tua bertanggung jawab atas peradangan kronis serta degradasi ECM. Gambar 2.2 menjelaskan jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam penurunan kolagen hingga *photoaging* yang diperantarai UV<sup>52</sup>.

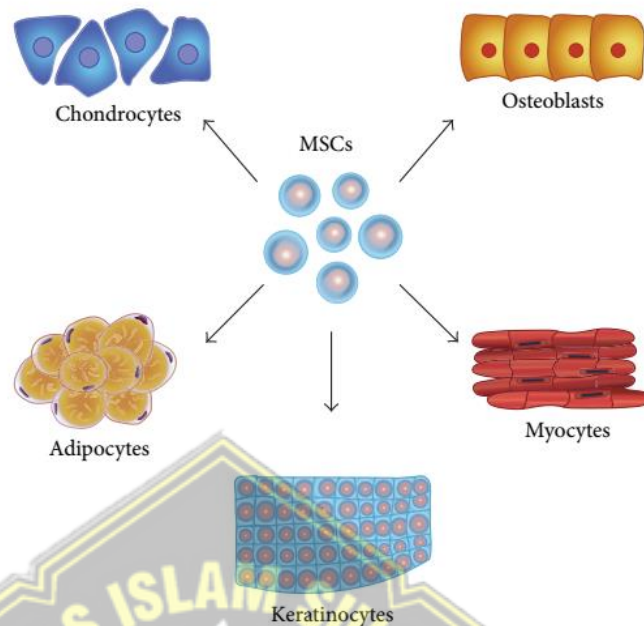




**Gambar 2.2.** Jalur Pensinyalan Utama *Collagen Loss* dan *Photoaging*<sup>52</sup>

### 2.3. MSCs

MSCs dicirikan mempunyai kemampuan untuk memperbarui diri dan mampu berdiferensiasi ke dalam banyak garis keturunan jaringan, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit. MSC diperoleh dari sejumlah jaringan, termasuk sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat, MSC juga ditandai oleh ekspresi permukaan CD penanda, termasuk CD44+, CD73+, CD90 +, dan CD105+, dan dibedakan dari sel hematopoietik oleh kurangnya CD34, CD45, CD14, dan HLA-DR. MSC kemampuan imunomodulator, reparatif, dan regeneratif melalui pensinyalan parakrin, yang memiliki potensi terapi yang besar<sup>52</sup>.



**Gambar 2.3.** Kemampuan Diferensiasi dari MSC<sup>53</sup>

### 2.3.1. Fungsi

MSC berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Hal ini dikarenakan *stem cell* memiliki kemampuan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi serta mampu untuk menghasilkan berbagai produk seperti faktor pertumbuhan dan sitokin. *Stem cell* juga mampu berkomunikasi secara parakrin maupun autokrin melalui sitokin yang dihasilkan. Kemampuan *stem cell* berkomunikasi secara parakrin yaitu dengan cara menstimulasi pengaktifan sel lain dalam proses penyembuhan. *Stem cell* juga memiliki kemampuan untuk *homing* yaitu kemampuan sel untuk menuju organ target sebagai mekanisme awal proses penyembuhan sebelum akhirnya menempel, proliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan<sup>54</sup>.

Kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan sel membuat MSC menarik secara klinik. Berbagai jurnal penelitian melaporkan MSC terlibat kuat dalam restorasi dan regenerasi berbagai kerusakan dan atau regenerasi jaringan<sup>55</sup>, diantaranya adalah:

1. Neurodeneratif, seperti stroke, Parkinson, Alzheimer dan Huntington.
2. Lesi Kardiovaskuler, seperti infark miokard dan peripheral vaskuler iskemia.
3. Disfungsi dan disufisiensi hormonal, seperti penyakit diabetes mellitus.
4. Sistem imunitas, seperti autoimun.
5. Muskuloskeletal, seperti fraktur, osteoporosis dan osteoarthritis
6. Luka kulit kronis, ulkus kornea

### 2.3.2. Mobilisasi MSC

Sudah dibuktikan bahwa MSC, ketika ditransplantasikan secara sistemik, menunjukkan kemampuan untuk menuju ke lokasi kerusakan jaringan pada hewan coba. Hal ini menunjukkan bahwa MSC memiliki kapasitas untuk bermigrasi. Mekanisme migrasi MSC masih tetap belum jelas. Reseptor kemokin serta ligannya dan molekul adhesi memainkan peranan yang penting dalam mekanisme *homing* pada jaringan yang spesifik melalui leukosit. Banyak penelitian telah melaporkan ekspresi fungsional berbagai reseptor



kemokin dan molekul adhesi pada MSC manusia. Memanfaatkan potensi migrasi dari MSC oleh modulasi interaksi reseptor kemokin merupakan cara yang ampuh untuk meningkatkan kemampuan MSC untuk memperbaiki kelainan bawaan dari jaringan *mesenchymal* atau memfasilitasi perbaikan jaringan *in vivo*<sup>56</sup>.

Mediator sinyal akan dilepaskan oleh suatu jaringan yang rusak yang tujuannya untuk memobilisasi MSC agar menuju ketempat jaringan yang rusak tersebut. Terdapat banyak jenis mediator sinyal yaitu VEGF (*vascular endothelial growth factor*), *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), *chemokines*, *erythropoietin* (EPO), *stromal-derived factor-1* (SDF-1), *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), *fibroblast growth factor*, *angiopoietin-2*, *platelet-derived growth factor-CC*, *stem cell factor* (SCF), *placental growth factor* (PlGF), dan interleukin (IL)-8, IL-6, IL-3, IL-2, serta IL-1 $\beta$ <sup>57</sup>.

### 2.3.3. Konsep *Small Molecule Growth Factor* MSC

Terminologi fungsional MSC didasarkan pada kemampuannya dalam menskresi berbagai *soluble molecule* secara parakrin. Konsep parakrin adalah komunikasi MSC dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepaskan oleh MSC. Secara spesifik, konsep *small molecule growth factor* MSC didasarkan pada<sup>58</sup>:

### 1. Kompleksitas teknik isolasi MSC

Sebagaimana diketahui teknik dan metode dalam mengisolasi MSC membutuhkan teknik yang kompleks disamping kerja aseptis serta waktu kultur (selama beberapa minggu) untuk mendapatkan turunan MSC yang homogen dengan potensi *stemness* tinggi, terutama kemampuan multi-diferensiasi menjadi berbagai sel jaringan spesifik. Berbagai faktor harus dikendalikan untuk mencapai hasil optimum, karena banyak faktor yang ikut menentukan hasil akhir isolasi.

### 2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat

Berbagai hasil penelitian melaporkan bahwa waktu paruh kehidupan MSC ketika berintegrasi dalam jaringan cedera pasca transplantasi adalah singkat, sehingga kemungkinan MSC melakukan fungsi regenerasi tidak optimal. Berbagai faktor internal yang terjadi dalam jaringan cedera ikut mempengaruhi waktu paruh kehidupan MSC.

### 3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi

Laporan penelitian terkini mengungkapkan bahwa sebagian besar MSC yang diberikan lewat intravena akan terjebak dalam paru sebagai *small* emboli (tidak menimbulkan oklusi vaskuler). Sekalipun demikian, MSC yang terjebak tersebut tetap akan melepaskan berbagai molekul antiinflamasi, disamping pro-regenerasi. Hal ini memunculkan spekulasi bahwa *small*



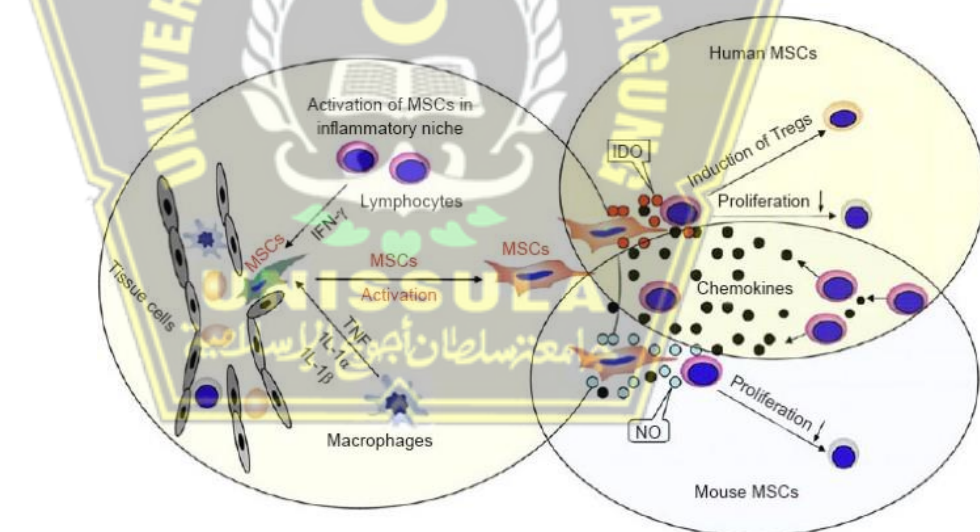
*molecule* dan *exosome* yang dilepas oleh MSC secara parakrin merupakan faktor utama dalam regenerasi jaringan.

#### 2.3.4. Induksi *Small Molecule* dan *Exosome* MSC

Begitu pentingnya peranan *small molecule* dan *exosome* MSC ini, sehingga memunculkan berbagai upaya dalam menghasilkan *small molecule* dan *exosome* secara *in-vitro*. Secara spesifik induksi *small molecule* growth factor MSC dapat dibagi menjadi 2<sup>59</sup>, yaitu:

##### 1. Induksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi

Secara teoritis, MSC yang diaktivasi sebelumnya oleh TNF- $\alpha$  dapat melepas berbagai molekul anti-inflamasi.



**Gambar 2.4.** Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC<sup>60</sup>

##### 2. Induksi MSC dengan teknik hipoksia

MSC yang diinkubasi dalam keadaan hipoksia akan melepaskan berbagai molekul pro-regenerasi. Hal ini memunculkan teori *hypoxic preactivated MSC-induced soluble*

*molecule* yaitu berbagai molekul terlarut dalam medium dilepas MSC yang mengalami hipoksia. Kondisi hipoksia pada MSCs diketahui dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 sebagai *small molecule* dan ekspresi berbagai macam antioksidan, seperti GPX, superoxide dysmuthase (SOD)1, SOD2, catalase (CAT) dan sirtuin (SIRT)1 dan 3 yang terakumulasi di dalam *exosome*. Produksi IL-10 oleh MSCs dapat menghambat faktor transkripsi nuclear factor kappa B yang merupakan pemicu overekspresi ROS. Sisi lain, berbagai macam antioksidan yang diekspresikan secara langsung oleh MSCs melalui *exosome*, seperti GPX mampu mengaktivasi faktor transkripsi NRF2 yang berujung pada peningkatan ekspresi antioksidan<sup>61</sup>. Sisi lain, berbagai miRNA yang terkandung dalam *exosome* MSCs hypoxia juga mampu berperan dalam inhibisi stres oksidatif, seperti miR21, miR-22-3p dan miR-215-5p<sup>62,63</sup>.

#### 2.4. Ultraviolet B (UVB)

Radiasi ultraviolet (UV) sinar matahari dibagi menjadi UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) dan UVC (200–280 nm). Sekitar 90% Sinar UV yang mencapai bumi merupakan UVA, 10% merupakan UVB, sedangkan UVC seluruhnya diserap oleh atmosfer bumi. Berdasarkan kedua UV yang mampu menembus permukaan bumi, UVB merupakan UV yang dapat menembus epidermis dan mencapai bagian atas dermis dan dapat menginduksi kerusakan DNA sel-sel kulit dengan meningkatkan konsentrasi

*Reactive Oxygen Species* (ROS)<sup>63</sup>. Paparan jangka panjang terhadap UVB dapat menyebabkan *photoaging* yang memfasilitasi penuaan kulit dan melanogenesis<sup>64</sup>.

#### 2.4.1. *Photoaging*

*Photoaging* merupakan penuaan kulit ekstrinsik yang menyebabkan penuaan dini pada kulit melalui paparan kumulatif radiasi ultraviolet (UV) dari Matahari maupun sumber UV buatan<sup>65</sup>. *Photoaging* secara klinis ditandai dengan warna kulit yang tidak merata (hiperpigmentasi), rona kulit yang memucat kekuningan, kerutan (bisa halus, kasar atau keduanya), kulit yang atrofi, kulit menjadi kendur, telangiektasis, solar elastosis, actinic purpura, hingga pembentukan lesi prakanker, kanker kulit, dan melanoma<sup>66</sup>.

**Tabel 2.1. Perbandingan perubahan histologis dan klinis yang terbukti pada penuaan kronologis dan *Photoaging*<sup>67</sup>**

|                              | <b>Chronological aging</b>                                                                                                                                       | <b>Photoaging</b>                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Histological features</i> | Kolagen pendek, tipis, tidak teratur, Atrofi epidermis Hilangnya rete pegs, Perataan sambungan epidermis-dermal Berkurangnya melanosit, Langerhans, dan sel mast | Elastosis Fragmentasi kolagen Ketebalan epidermis tidak teratur Peningkatan glikosaminoglikan dan proteoglikan Peningkatan penanda inflamasi (sel mast, eosinofil, sel mononuklear) Melanogenesis |
| <i>Clinical features</i>     | Kulit tipis<br>Kerutan halus<br>Xerosis<br>Kelembekan<br>Angioma ceri<br>Keratosi seboroik                                                                       | Kulit atrofi<br>Kerutan kasar<br>Kulit kasar<br>Lentigo<br>Penampilan kecokelatan<br>Penampilan seperti batu bulat berwarna kuning<br>Telangiektasia<br>Memar, Dermatitis akibat sinar matahari   |

Sinar UV yang mencapai lapisan dermis lebih banyak pada kulit yang berwarna cerah dibandingkan dengan kulit berwarna gelap sehingga individu dengan tipe kulit Fitzpatrick rendah cenderung lebih rentan terhadap *photoaging*<sup>68</sup>. Terdapat enam tipe warna kulit yang diklasifikasikan Fitzpatrick berdasarkan reaksinya terhadap paparan sinar matahari serta radiasi sinar UV, mulai dari sangat pucat (tipe kulit I) hingga sangat gelap (tipe kulit VI). Warna alami atau pigmentasi kulit ditentukan oleh jumlah, tipe dan susunan melanin di kulit. Pigmen melanin memberikan perlindungan alami terhadap paparan sinar UV yakni *Sun Protection Factor* (SPF)<sup>69</sup>. Kulit yang gelap lebih tahan terhadap kerusakan kulit akibat paparan sinar UV dikarenakan kulit yang lebih gelap memiliki SPF alami yang lebih tinggi yakni 13,4 jika dibandingkan kulit bangsa Kaukasia yang hanya memiliki SPF alami 3-4 atau bahkan kurang, sehingga manifestasi penuaan kulit lebih ringan dan terjadi lebih lambat 10 hingga 20 tahun dibandingkan dengan kulit yang lebih terang<sup>70</sup>.

#### 2.4.2. Kolagen

Kolagen Merupakan protein (polipeptida) ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe kolagen, jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia<sup>71</sup>. Kolagen-1 merupakan jenis serabut kolagen terbanyak

yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit. Serabut kolagen-1 berperan penting dalam pembentukan jaringan parut. Kolagen-2, kolagen-9, kolagen-10, kolagen-11 ditemukan pada kartilago. Kolagen-3 banyak dijumpai pada kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. Kolagen-3 penyebarannya hampir sama dengan kolagen-1. Sedangkan kolagen-7 kebanyakan lokasinya terletak pada anchoring fibril di dermal epidermal junction pada kulit, mukosa dan servik. Kolagen-7 juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah<sup>72</sup>.

Telah banyak dibuktikan bahwa tipe kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen-1 dan kolagen-3 yang berfungsi pada pertahanan mekanik. Akan tetapi tipe kolagen lain yang juga ada pada kulit, seperti kolagen-5, kolagen-6, kolagen-7, kolagen-12 ditemukan dalam jumlah minimal yang diperkirakan ikut menunjang, akan tetapi peran yang pasti belum jelas<sup>72</sup>. Karena kolagen-1 yang mendominasi organ kulit, maka kolagen-1 yang akan diukur pada penelitian kali ini.

Pada kulit yang mengalami *Photoaging*, serat kolagen mengalami disorganisasi. Serabut kolagen dan kumpulan serat kolagen berkurang serta mengalami homogenisasi. Kulit yang mengalami *Photoaging* prekursor kolagen Tipe I dan III dan

crosslink-nya berkurang<sup>73</sup>. Dengan menggunakan antibody terhadap kolagen Tipe I, tidak ditemukan ada perubahan kolagen setelah radiasi UVB-B selama 10 minggu. Peningkatan kolagen pada Tipe III dimulai setelah terpapar UVB-B selama 12 minggu (5 hari perminggu dengan  $\frac{1}{2}$  MED setiap pemaparan)<sup>74</sup>.

Kolagen dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik meliputi sinar ultraviolet, polusi, dan diet. Faktor ekstrinsik dapat memperberat kerusakan kolagen yang disebabkan oleh faktor intrinsik. Pengaruh faktor genetika tampak pada studi penuaan kulit pada berbagai etnis. Etnis dengan pigmentasi lebih gelap, seperti ras Afrika-Amerika, memiliki daya perlindungan yang lebih tinggi terhadap Ultraviolet. Sinar Ultraviolet memicu pembentukan radikal bebas sehingga merusak kolagen kulit. Kulit ras Afrika - Amerika mengandung lipid interseluler lebih banyak daripada ras Kaukasia sehingga lebih resisten terhadap penuaan. Kerutan wajah pada ras Asia terjadi lebih lambat dan lebih ringan daripada ras Kaukasia<sup>75</sup>.

Penurunan kolagen kulit tampak signifikan pada wanita menopause. Kolagen kulit orang dewasa berkurang 1 % setiap tahun. Penurunan kolagen ini lebih tampak pada wanita daripada pria. Kulit kendur dan kerutan wajah disebabkan kerusakan akumulasi kolagen. Sinar ultraviolet juga memicu pembentukan radikal bebas, yang



dapat bereaksi dengan protein seperti kolagen sehingga terjadi kerusakan kolagen<sup>76</sup>.

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast yang menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast kulit yang mengalami kerusakan akibat Ultraviolet. Pada kulit yang terlindungi sinar matahari dengan kolagen Tipe I yang terdegradasi sebagian diperoleh melalui percobaan in-vitro kolagen yang dicampur dengan MMPs yang diinduksi oleh sinar Ultraviolet, yang terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu; mekanisme secara langsung terjadi degradasi kolagen secara tidak langsung melalui hambatan sintesis kolagen oleh degradasi kolagen yang terbentuk dari MMP. Kolagen Tipe I yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya<sup>77</sup>. Model yang menggambarkan kerusakan akibat paparan sinar UVB pada jaringan kulit. Paparan ultraviolet (panah bergerigi) mengaktifkan faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin pada permukaan keratinosit dan fibroblast. Reseptor aktif menstimulasi jalur sinyal transduksi dan merangsang faktor transkripsi AP-1, yang mempengaruhi transkripsi gen MMP. Dalam fibroblas, AP-1 juga menghambat ekspresi gen prokolagen. MMP disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dan memecah kolagen dan protein lain yang terdapat pada matriks ekstraselular dermis. Perbaikan kerusakan kulit yang tidak sempurna akan mengganggu integritas fungsional dan struktural dari matriks ekstraseluler.

Paparan sinar matahari berulang menyebabkan akumulasi kerusakan kolagen yang akhirnya menghasilkan kerutan yang spesifik (*photodamage skin*)<sup>78</sup>.

## 2.5. Pengaruh EH-MSCs terhadap Kadar MMP-1 dan MDA pada Tikus yang dipapar UVB

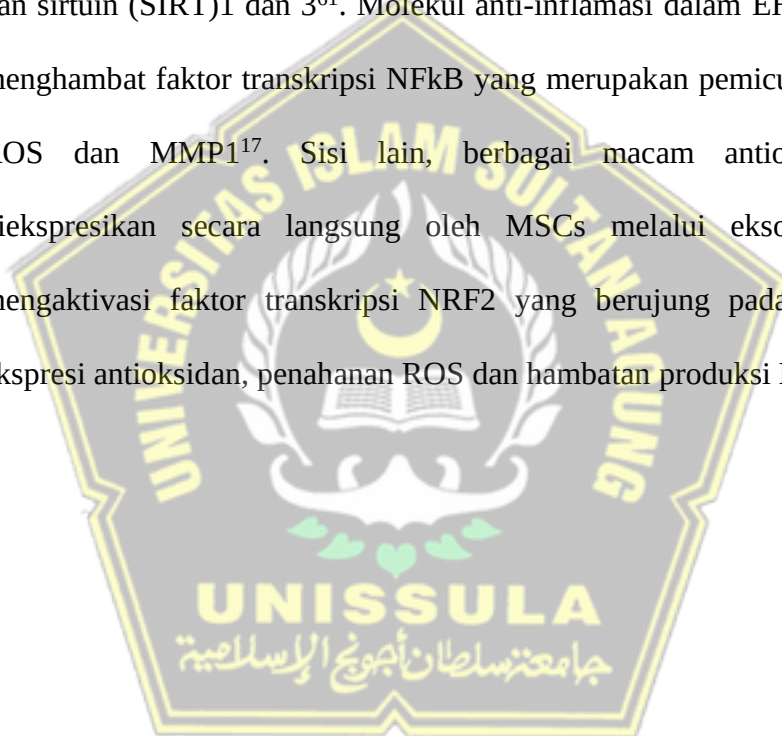
Paparan terhadap radiasi UVB dapat menginduksi penuaan kulit dini (*photoaging*) dan penurunan kadar kolagen dermal<sup>1</sup>. Mekanisme molekuler yang terlibat dalam *photoaging* yang diinduksi UVB termasuk kerusakan DNA, produksi ROS dan peradangan<sup>2</sup>. Jalur pensinyalan NFκB memainkan peran penting dalam respons terhadap generasi ROS yang diinduksi UVB di kulit. Iradiasi UVB menginduksi respon sinyal inflamasi melalui aktivasi faktor transkripsi, NF-κB yang kemudian akan meningkatkan produksi ROS disamping sitokin proinflamasi. Produksi ROS dan peningkatan aktivitas NFκB akan menginduksi ekspresi gen yang terlibat dalam respons inflamasi dan proliferasi sel, termasuk MMP-1<sup>3</sup>.

Peningkatan produksi ROS secara normal mampu mengaktivasi pathway NRF2 untuk memproduksi berbagai enzim antioksidan, sehingga kondisi sel dapat kembali homeostasis. Namun, paparan UVB yang berlebih berdampak pada ketidakseimbangan kadar ROS dan antioksidan intraseluler sehingga berujung pada *photoaging* dan *collagen loss*<sup>4</sup>. Ketidakseimbangan ROS dan antioksidan intraseluler secara spesifik dapat menghasilkan kerusakan yang signifikan pada berbagai struktur seluler, termasuk lipida. Kerusakan lipid ini dapat menghasilkan produk sampingan seperti MDA,



yang menjadi tanda kerusakan oksidatif yang luas pada tingkat molekuler<sup>46</sup>. Akumulasi MDA dapat menjadi indikator stres oksidatif yang signifikan dan dapat berujung pada berbagai kondisi patologis, termasuk penuaan kulit<sup>47</sup>.

MSCs prekondisi hipoksia mensekresikan vesikel ekstraseluler yang mengandung berbagai macam molekul antiinflamasi dan antioksidan, seperti IL-10, TGFb, GPX, superoxide dysmuthase (SOD)1, SOD2, catalase (CAT) dan sirtuin (SIRT)1 dan 3<sup>61</sup>. Molekul anti-inflamasi dalam EH-MSCs dapat menghambat faktor transkripsi NFkB yang merupakan pemicu overekspresi ROS dan MMP<sup>17</sup>. Sisi lain, berbagai macam antioksidan yang diekspresikan secara langsung oleh MSCs melalui eksosom mampu mengaktivasi faktor transkripsi NRF2 yang berujung pada peningkatan ekspresi antioksidan, penahanan ROS dan hambatan produksi MDA<sup>12</sup>.



### **BAB III**

#### **KERANGKA TEORI**

##### **3.1. Kerangka Teori**

Paparan UVB dapat menyebabkan kerusakan langsung pada DNA sel kulit, mengaktifkan jalur p53 sebagai respons terhadap kerusakan DNA<sup>79</sup>. Aktivasi p53 menyebabkan pelepasan sitokrom C dari mitokondria sebagai respons terhadap stres oksidatif. Pelepasan sitokrom C mengaktifkan jalur kematian sel melalui aktivasi caspase 3, yang merupakan mediator utama dalam proses apoptosis. Apoptosis sel akibat paparan UVB akan menyebabkan terbentuknya DAMP yang dideteksi oleh sel imun melalui reseptor TLR. Ikatan antara DAMP dan TLR akan memicu aktivasi Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K). Pada paparan UVB, aktivasi PI3K akan menfosforiasi dan mengaktifkan NF- $\kappa$ B melalui pemecahan kompleks inhibitor IKK.<sup>80</sup> Aktivasi NF- $\kappa$ B menginduksi ekspresi gen yang terlibat dalam respons inflamasi dan proliferasi sel, termasuk MMP-1<sup>3</sup>.

Paparan UVB memicu stres oksidatif melalui aktivasi NADPH oksidase yang memicu pelepasan elektron dari molekul oksigen, membentuk superoksida yang termasuk kelompok ROS. Senyawa ROS ini bertindak sebagai molekul reaktif yang sangat berbahaya, yang dapat mengoksidasi berbagai molekul dalam sel, termasuk lipid, protein, dan DNA.<sup>2</sup> Peningkatan produksi ROS, terjadi aktivasi dari mekanisme seluler pengaturan antioksidan, terutama melalui jalur NRF2. Secara normal, NRF2 terikat pada protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated Protein 1), yang

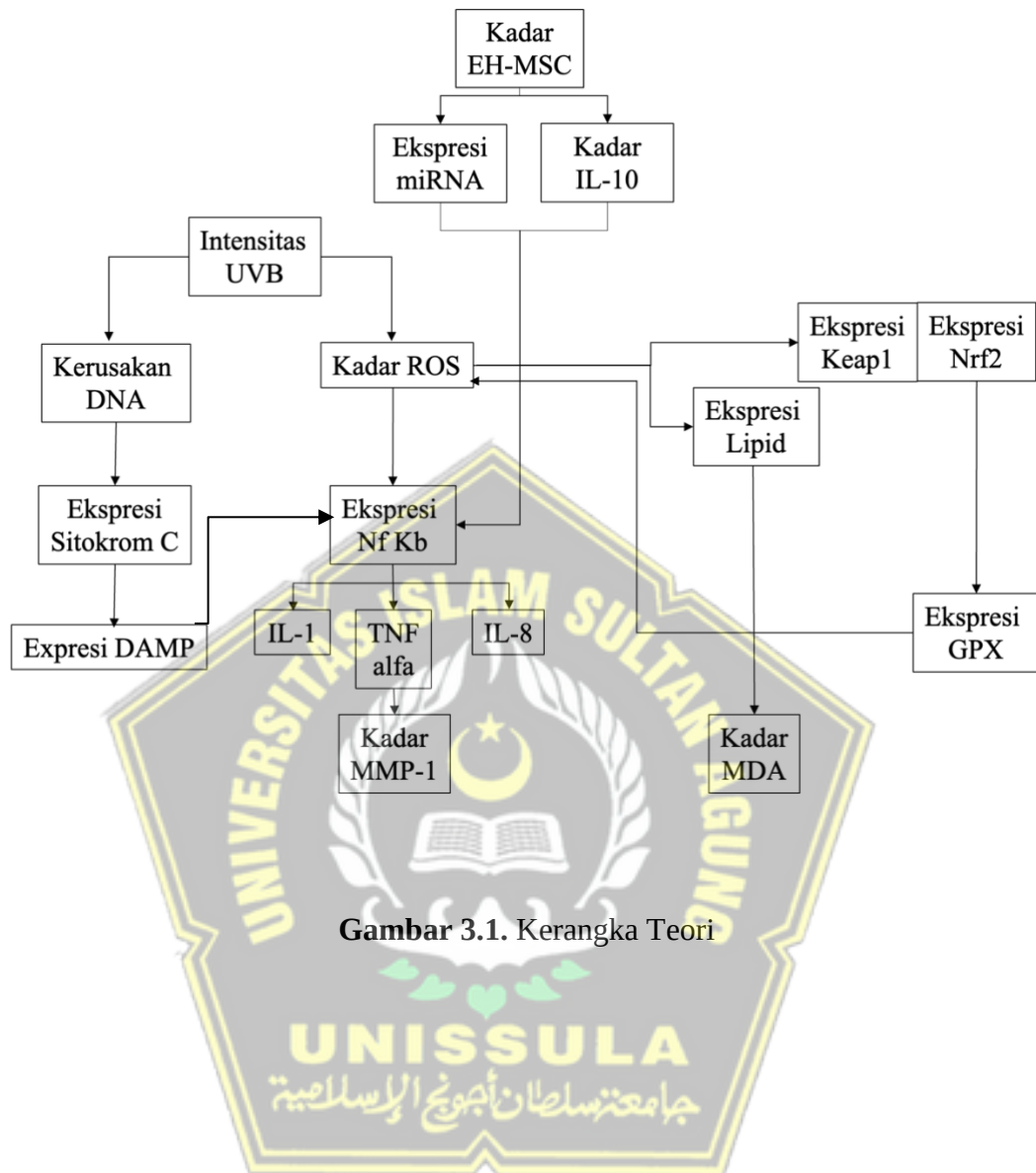
bertanggung jawab untuk menargetkannya untuk degradasi. Namun, dalam kondisi stres oksidatif, ROS menyebabkan perubahan konformasi pada Keap1, yang memungkinkan NRF2 untuk terlepas dan bermigrasi ke inti sel. Di inti sel, NRF2 berikatan dengan elemen respon antioksidan (ARE), yang mengontrol ekspresi gen yang terlibat dalam pertahanan antioksidan. Ini termasuk enzim seperti Superoxide Dismutase (SOD) dan Glutathione Peroxidase (GPX), yang bertugas menghilangkan ROS dan mencegah kerusakan sel yang lebih lanjut<sup>81</sup>.

Namun demikian, paparan UVB yang berlangsung terus-menerus atau terlalu intens, mekanisme pertahanan antioksidan dapat terganggu, yang menyebabkan akumulasi ROS dalam sel. Hal ini dapat menghasilkan kerusakan yang signifikan pada berbagai struktur seluler, termasuk lipid<sup>8</sup>. Kerusakan lipid ini dapat menghasilkan produk sampingan seperti Malondialdehyde (MDA), yang menjadi tanda kerusakan oksidatif yang luas pada tingkat molekuler<sup>9</sup>. Akumulasi MDA dapat menjadi indikator stres oksidatif yang signifikan dan dapat berujung pada berbagai kondisi patologis, termasuk penuaan kulit<sup>10</sup>.

MSCs prekondisi hipoksia mensekresikan vesikel ekstraseluler yang mengandung berbagai macam molekul antiinflamasi dan antioksidan, seperti IL-10, TGFb, GPX, superoxide dysmuthase (SOD)1, SOD2, catalase (CAT) dan sirtuin (SIRT)1 dan 3<sup>61</sup>. Molekul anti-inflamasi dalam EH-MSCs dapat menghambat faktor transkripsi NFkB yang merupakan pemicu overekspresi ROS dan MMP1<sup>17</sup>. Sisi lain, berbagai macam antioksidan yang

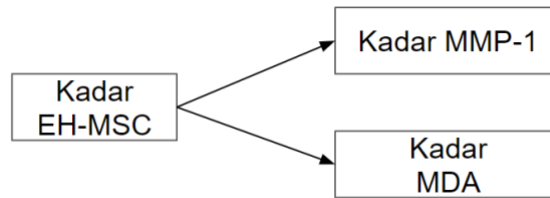
diekspresikan secara langsung oleh MSCs melalui eksosom mampu mengaktivasi faktor transkripsi NRF2 yang berujung pada peningkatan ekspresi antioksidan, penahanan ROS dan hambatan produksi MDA<sup>12</sup>. Gambar kerangka teori terlihat pada Gambar 3.1.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

### 3.2. Kerangka Konsep



**Gambar 3.2.** Kerangka Konsep

### 3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian injeksi EH-MSC 200 uL dan 300 uL dibandingkan kontrol terhadap kadar MMP-1 dan MDA yang diinduksi sinar UVB pada tikus galur Wistar.



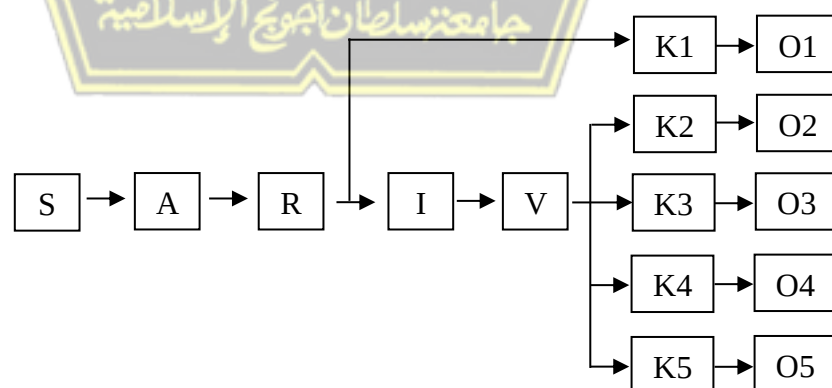
## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimen *in-vivo* yang melibatkan tikus yang mengalami kehilangan kolagen akibat paparan sinar UVB sebagai objek studi. Desain penelitian yang diterapkan adalah *Randomized Post Test only Control Group Design*. Pemilihan desain ini dilakukan untuk memastikan validitas hasil dengan membandingkan kelompok kontrol yang tidak mendapat perlakuan dengan kelompok perlakuan setelah intervensi atau perlakuan dilakukan. Dengan demikian, efek perlakuan yang diamati dapat diatribusikan secara lebih pasti kepada intervensi yang diberikan, menghasilkan kesimpulan yang lebih kuat tentang dampak paparan sinar UVB pada *collagen loss* pada tikus.

Penelitian ini terdiri dari 5 perlakuan sebagai berikut:



**Gambar 4.1.** Rancangan Penelitian



Keterangan :

S = Sampel

A = Aklimatisasi

R = Randomisasi

I = Induksi UVB

K1 = Tikus sehat tanpa paparan UVB

K2 = Tikus menerima paparan UVB diberi perlakuan injeksi secara subcutan larutan NaCl 0.9% dengan dosis 200 uL

K3 = Tikus menerima paparan UVB diberi perlakuan injeksi secara subcutan larutan Hyaluronic Acid (HA) dengan dosis 200 uL

K4 = Tikus menerima paparan UVB diberi perlakuan injeksi secara subcutan larutan EH-MSD dengan dosis 200 uL

K5 = Tikus menerima paparan UVB diberi perlakuan injeksi secara subcutan larutan EH-MSD dengan dosis 300 uL

O = Observasi MMP-1 dan kadar MDA

## 4.2. Variabel penelitian dan definisi operasional

### 4.2.1. Variabel penelitian

#### a. Variabel Bebas

Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa injeksi secara subcutan EH-MSD dosis 200 uL dan 300 uL

#### b. Variabel Tergantung

Variabel terikat penelitian ini adalah Kadar MMP-1 dan MDA

#### c. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah Sinar UV-B

#### d. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol penelitian ini antara lain :

1. Intensitas dan jumlah paparan sinar UVB yang diberikan pada masing-masing percobaan.
2. Durasi paparan UVB yang diterapkan.
3. Faktor-faktor lingkungan selama penelitian, termasuk kondisi suhu, kelembaban udara, dan kecerahan cahaya di dalam ruang penelitian tikus.
4. Komposisi makanan yang diberikan kepada tikus.
5. Karakteristik seperti usia dan jenis kelamin tikus, yang dapat mempengaruhi respons terhadap paparan sinar UVB.
6. Kondisi kesehatan awal sistem kekebalan dan kondisi kulit tikus sebelum terkena paparan sinar UVB.

#### 4.2.2. Definisi Operasional Variabel

##### 4.2.2.1. EH-MS

Eksosom yang dihasilkan dari mesenchymal stem cell (MSC) dalam kondisi hipoksia merupakan vesikel ekstraseluler yang dilepaskan ke dalam medium kultur oleh sel MSC. Vesikel ini memiliki ukuran antara 30 hingga 150 nanometer dan mengekspresikan protein permukaan antara lain CD9, CD63, dan CD81. Proses isolasi eksosom ini dilakukan menggunakan metode tangential flow

filtration. Eksosom hipoksia mesenchymal stem cell diinjeksikan secara subkutan di daerah dorsal yang terpapar sinar UVB.

Satuan : mL

Skala : rasio

#### 4.2.2.2. Kadar MMP-1

MMP-1 adalah enzim protease yang terlibat dalam degradasi kolagen dalam proses penuaan kulit. Analisis kadar MMP-1 diambil dari sampel jaringan kulit yang dikoleksi pada hari ke-15, kemudian dihomogenisasi dan dianalisis menggunakan teknik ELISA. Pembacaan dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

Satuan : pg/mL

Skala : ratio

#### 4.2.2.3. Kadar MDA

Malondialdehyde adalah produk sampingan dari oksidasi lipid yang dapat digunakan sebagai indikator stres oksidatif. Penilaian kadar MDA dianalisis dari sampel jaringan kulit yang dikumpulkan pada hari ke-15 setelah dihomogenisasi dan dianalisis menggunakan metode ELISA. Pembacaan dilakukan menggunakan alat spektrofotometer pada panjang

gelombang 450 nm.

Satuan : pg/mL

Skala : rasio

#### 4.2.2.4. Sinar UV B

Sinar UV-B dihasilkan oleh perangkat UV-B narrowband model TL-F72-100W/12. Paparan sinar UV-B dilakukan secara teratur, lima kali dalam seminggu, selama tiga minggu berturut-turut. Dosis paparan sinar UV-B setara dengan 1 MED, dengan setiap paparan berlangsung selama 8 menit pada jarak 20 cm.

### 4.3. Subyek Penelitian dan Sample Penelitian

#### 4.3.1. Obyek penelitian

Obyek penelitian terdiri dari tikus jantan galur Wistar berusia 6-8 minggu, dengan berat sekitar  $225 \pm 22,5$  gram (CV=10%), dan telah mendapat persetujuan dari dokter hewan. Tikus dipelihara dalam lingkungan dengan suhu berkisar antara 20 hingga 25°C. Mereka diberi makanan pellet dan air minum secara bebas. Sebelum dilakukan perlakuan, tikus diaklimatisasi dalam kandang selama 1 minggu.

### 4.3.2. Sampel Penelitian

#### 4.3.2.1. Kriteria inklusi

- a) Tikus jantan galur Wistar
- b) Usia 6-8 minggu
- c) Berat badan  $225 \pm 22,5$  gram (CV=10%)
- d) Dinyatakan sehat tanpa kelainan anatomis

#### 4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

- a) Memiliki kelainan anatomis.
- b) Pernah menjadi subyek penelitian sebelumnya.
- c) Tikus sakit selama masa penelitian.

#### 4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

- a) Tikus mengalami infeksi atau
- b) Tikus mati selama penelitian.

### 4.3.3. Besar Sampel

Jumlah tikus (n) yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus dari Federer sebagai berikut :

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow 5 \text{ (pembulatan)}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut dan mempertimbangkan adanya resiko kematian tikus selama proses penelitian, sejumlah 10%

tikus ditambahkan untuk mengantisipasi mortalitas selama penelitian, sehingga jumlah sampel subyek penelitian ditambahkan satu ekor tikus per kelompok. Dengan demikian, total tikus Wistar jantan yang digunakan adalah 30 ekor.

#### **4.4. Alat dan Bahan**

##### **4.4.1. Alat penelitian**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

1. BSC
2. CO2 inkubator
3. Sentrifuge
4. Upulse tangential flow filtration
5. Membran filtrasi TFF berukuran 100 kda dan 500 kda
6. Flowcytometer
7. Mikroskop inverted
8. Incubator
9. Mikropipet
10. Tabung sentrifuge
11. Pelat kultur sel
12. Botol beher
13. Shaker
14. Ph meter
15. Autoclave
16. Lampu UV

#### 4.4.2. Bahan penelitian

Bahan yang dipakai dalam penelitian meliputi bahan kultur yang terdiri dari

1. DMEM
2. Fetal Bovine Serum
3. Phospat Buffer Saline
4. Antibiotik dan antijamur
5. Flask kultur
6. sentrifuge tube
7. pippet tip.
8. NaCl
9. Aquabidest
10. alkohol 70%
11. kapas steril
12. ketamin
13. xylazine
14. vial tube
15. RIPA buffer
16. pisau bisturi.
17. Elisa Kit Rat MDA (Elabscience No Cat: E-EL-R2856)
18. Elisa Kit Rat MMP-1 (Elabscience No Cat: E-EL-R2491).



## 4.5. Cara Penelitian

### 4.5.1. *Ethical clearance*

Setelah mendapatkan persetujuan dari pembimbing dan penguji *Ethical clearance* penelitian diajukan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang.

### 4.5.2. Pembuatan Eksosom

Ekosom MSC diisolasi dengan menggunakan metode TFF. Tahapan yang dilakukan meliputi pengumpulan media kultur MSC dalam botol steril dan penyaringan menggunakan alat uPulse TFF dengan filter 100 kDa dan 500 kDa untuk menghilangkan partikel besar. Hasil penyaringan kemudian divalidasi untuk kandungan EH- MSC menggunakan flow cytometry dengan penanda permukaan berupa CD81, CD63, dan CD9. Setelah divalidasi, hasil yang mengandung EH- MSC disimpan dalam tabung 2,5 mL dan disimpan pada suhu 2-8°C.

### 4.5.3. Penyinaran UV-B pada subyek penelitian

Setelah beradaptasi selama periode 7 hari, tikus disuntik dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb) secara intramuskular. Bagian punggung tikus kemudian dicukur dengan ukuran 2 x 3 cm. Tikus kemudian dikenai paparan sinar UV-B pada area yang telah dicukur dengan satu kali dosis minimal erythema (150mJ/cm<sup>2</sup>) selama 8 menit, dilakukan 5 kali dalam

seminggu selama tiga minggu. Setelah paparan UVB, perlakuan diberikan. Tikus pada kelompok K1 menerima suntikan NaCl sebanyak 200 uL, K2 tidak mendapatkan perlakuan apapun, sementara tikus pada kelompok K3 menerima suntikan HA sebanyak 200 uL. Sedangkan tikus pada kelompok perlakuan EH-MSD dosis 1 (K4) dan 2 (K5) menerima suntikan EH-MSD masing-masing dengan dosis 200 uL dan 300 uL pada hari ke-1 setelah tikus dinyatakan mengalami *collagen loss*. Prosedur ini dilakukan untuk mengevaluasi dampak perlakuan terhadap tikus setelah paparan UVB.

#### 4.5.4. Validasi Hewan Coba

##### 4.5.4.1. Makroskopis

Validasi makroskopis dilakukan untuk memverifikasi secara klinis keberhasilan dalam menciptakan model kehilangan kolagen pada hewan percobaan melalui paparan UVB. Hal ini dilakukan dengan melakukan pemeriksaan visual langsung pada kulit untuk mengevaluasi kerusakan kolagen pada hewan yang terpapar UVB, dibandingkan dengan mereka yang tidak terpapar. Tikus yang terpapar sinar UVB kemungkinan akan menunjukkan tanda-tanda kerutan kulit dibandingkan dengan tikus yang tidak terpapar UVB.

#### 4.5.4.2. Histopatology

Validasi histopatologi menggunakan metode pengecatan Masson Trichrome dilakukan melalui serangkaian langkah. Pertama, sampel preparat direndam dalam larutan hematoxylin untuk memberikan warna biru pada inti sel. Langkah selanjutnya, sampel direndam dalam larutan asam fosfat untuk melarutkan sitoplasma dan memberikan latar belakang merah muda. Kemudian, sampel direndam dalam larutan trichrome, yang memberikan warna hijau kebiruan pada jaringan kolagen dan merah pada elastin. Tahap terakhir meliputi proses dehidrasi, pembersihan, dan penutupan slide preparat sebelum diamati di bawah mikroskop. Keberhasilan pembuatan model hewan dianggap tercapai apabila terdapat penurunan kolagen dibandingkan dengan tikus yang tidak terkena paparan UVB.

#### 4.5.5. Analisis kadar MMP-3 dan MDA menggunakan ELISA

1. Pilihlah sumur yang telah ditetapkan untuk standar, blanko, dan sampel yang akan diuji.
2. Masukkan 100  $\mu$ L dari larutan standar, blanko, dan sampel ke masing-masing sumur yang telah dipilih.

3. Tutuplah pelat sumur dengan plastik penutup secara rapat untuk mencegah penguapan reagen, lalu inkubasikan selama 90 menit pada suhu 37°C.
4. Buang cairan dari tiap sumur tanpa membilas, dan segera tambahkan 100 µL larutan Antibodi Deteksi Biotinilasi ke masing-masing sumur.
5. Tutupi pelat dengan penutup baru dan inkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C.
6. Lakukan pencucian dengan menambahkan 350 µL larutan wash buffer ke tiap sumur, diulangi sebanyak 3 kali.
7. Tambahkan 100 µL Konjugat HRP ke setiap sumur.
8. Tutupi pelat dengan penutup baru, dan inkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C.
9. Buang larutan dari tiap sumur, lalu lakukan proses pembilasan sebanyak 5 kali seperti pada langkah 3.
10. Tambahkan 90 µL Reagen Substrat ke setiap sumur.
11. Tutupi pelat dengan penutup baru, dan inkubasikan selama sekitar 15 menit pada suhu 37°C.
12. Tambahkan 50 µL larutan Stop ke setiap sumur.
13. Ukurlah Optical Density (OD) dari masing-masing sumur menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

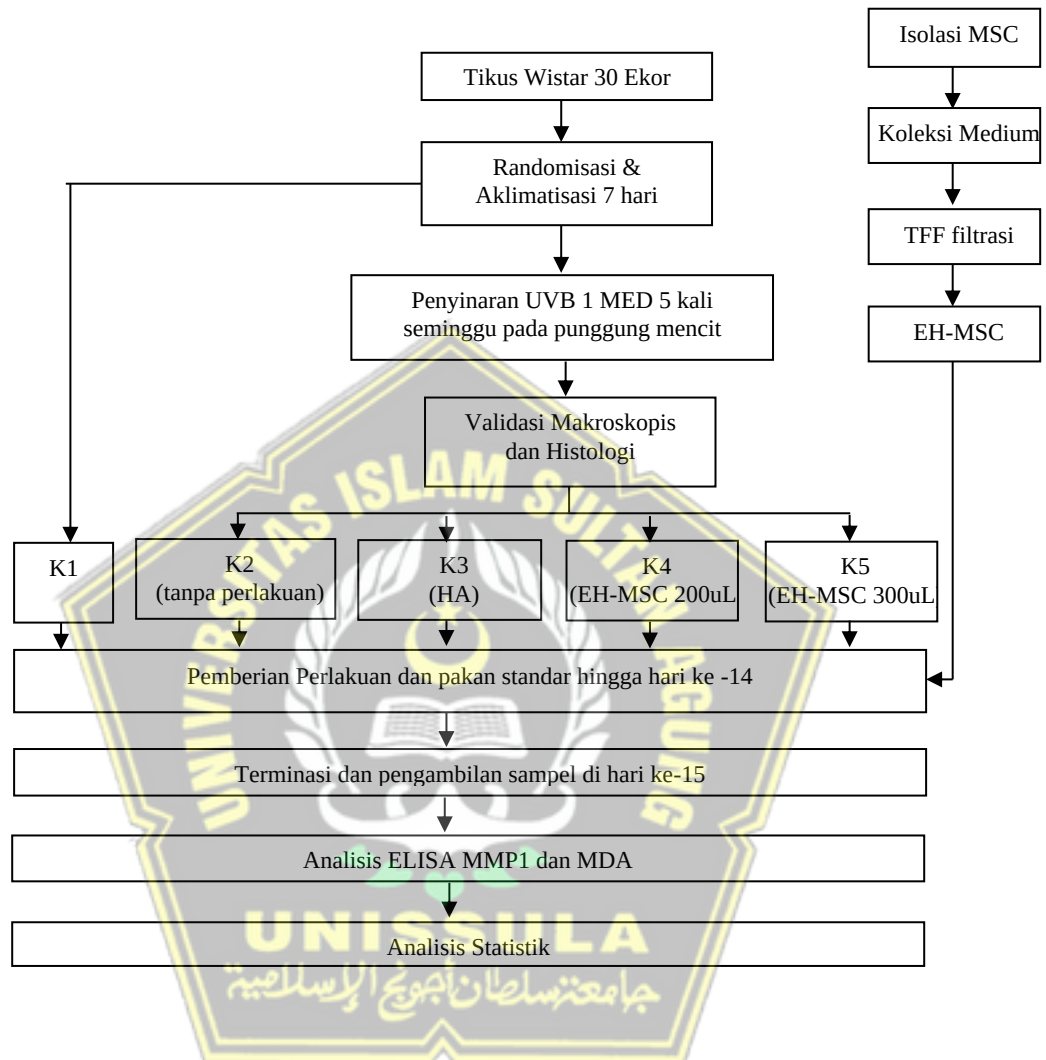
#### 4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Kegiatan penelitian meliputi Pembuatan EH-MSC, pemeliharaan, induksi hewan coba, dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia Semarang pada September-Oktober 2024.

#### 4.7. Analisa Data

Data yang terhimpun telah dianalisis dan dipresentasikan secara statistik menggunakan perangkat lunak SPSS for Windows. Informasi tentang kadar MMP-3 dan MDA pada tikus dalam penelitian ini dievaluasi melalui analisis deskriptif menggunakan skala data rasio. Selanjutnya, dilakukan pemeriksaan normalitas dan homogenitas data menggunakan uji Shapiro-Wilk dan Levene's Test. Apabila distribusi data menunjukkan normalitas ( $p > 0,05$ ) dan homogenitas ( $p > 0,05$ ), maka uji One-Way ANOVA dilaksanakan. Jika terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok, uji Post Hoc LSD digunakan untuk mengevaluasi perbedaan secara signifikan. Namun, apabila data menunjukkan distribusi normal tetapi tidak homogen ( $p < 0,05$ ), One-Way ANOVA tetap dilakukan, diikuti oleh uji Post Hoc Tamhane. Jika distribusi data tidak normal ( $p < 0,05$ ), uji Kruskal-Wallis digunakan, dengan uji Mann-Whitney untuk mengevaluasi perbedaan antar kelompok. Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS 26.0.

#### 4.8. Alur Penelitian



**Gambar 4.2.** Alur Penelitian

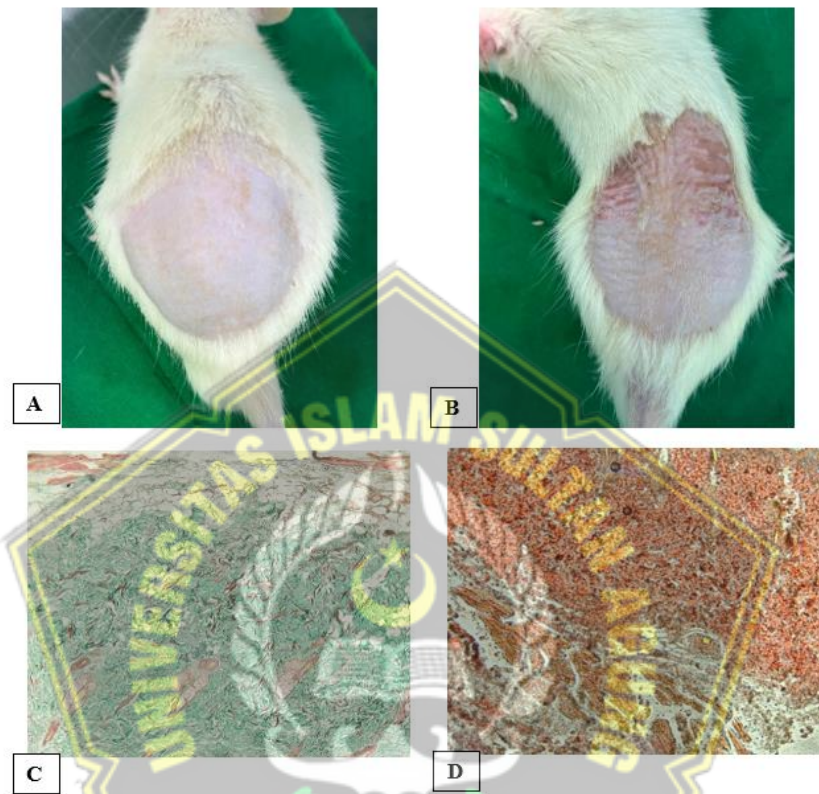
## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan September sampai Oktober 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 200-250 gram dan berumur 2-3 bulan yang di induksi UVB 302 nm dengan satu kali dosis minimal erythema (150mJ/cm<sup>2</sup>) selama 8 menit, dilakukan 5 kali dalam seminggu selama dua minggu. Penelitian ini menggunakan 30 ekor dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Pada penelitian ini di bagi menjadi 5 kelompok yaitu, kelompok K1 menerima suntikan NaCl sebanyak 200 uL, K2 tidak mendapatkan perlakuan apapun, sementara tikus pada kelompok K3 menerima suntikan HA sebanyak 200 uL secara subkutan. Sedangkan tikus pada kelompok perlakuan EH-MSC dosis 1 (K4) dan 2 (K5) menerima suntikan EH-MSC masing-masing dengan dosis 200 uL dan 300 uL secara subkutan pada hari ke-1 setelah tikus dinyatakan mengalami *collagen loss*. Pengamatan secara makroskopis dilakukan untuk melihat adanya *collagen loss* akibat paparan UVB dan berdasarkan hasil pengamatan terlihat adanya *collagen loss* pada mencit yang terpapar UVB dibandingkan dengan yang tidak terpapar sebagaimana terlihat pada Gambar 5.1. Selain itu untuk memperkuat validasi, analisis secara anatomi dilakukan dengan menggunakan pengecatan *Masson Trichome* untuk melihat densitas elastin akibat paparan UVB. Berdasarkan penelitian terdahulu, elastin dapat terlihat sebagai gambaran merah pada pengecatan tersebut. Berdasarkan hasil pengamatan secara anatomi didapatkan



hasil bahwa bahwa terjadi *collagen loss* pasca paparan sebagaimana yang ditunjukkan pada Gambar 5.1.



**Gambar 5.1.** Tidak terdapat kemerahan dan kerutan (A) , Tampak memerah dan kerutan (B), *Masson Trichrome* dengan warna biru yang menandakan adanya produksi kolagen (C), Kulit tikus UVB dengan menunjukkan warna merah yang menandakan ekspresi kolagen terhambat (D).

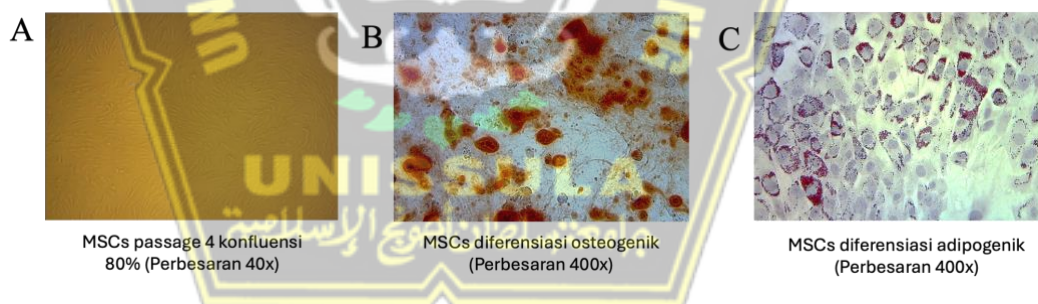
## 5.1. Hasil Penelitian

### 5.1.1. Hasil Validasi E-MSCs

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

setelah pasase ke-4 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle shape* (Gambar 5.2 A).

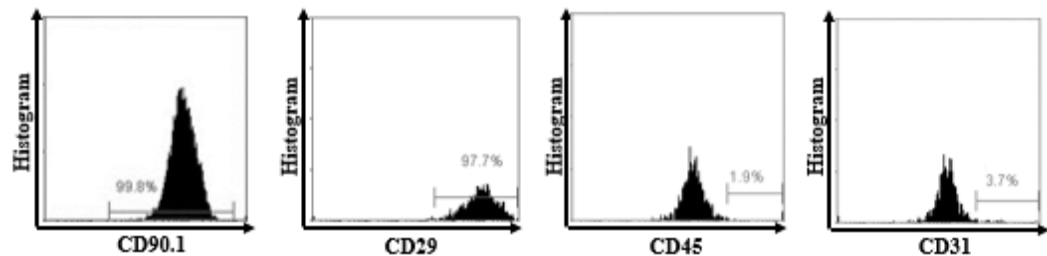
Sel MSCs dikultur dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik selama 14 hari untuk mengetahui kemampuan diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit sebagai salah satu metode validasi MSCs. Diferensiasi adipogenik MSCs ditunjukkan oleh sel yang berisi akumulasi droplet lipid dengan pewarnaan *Oil Red O* (Gambar 5.2 B). Gambaran diferensiasi osteogenik MSCs ditunjukkan oleh sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarin Red* Gambar 5.2 C. Depositi kalsium dan lemak hasil diferensiasi E-MSCs menjadi osteosit dan adiposit ditunjukkan dengan warna merah pada masing-masing kultur.



**Gambar 5.2.** (A) MSCs passage 4 konfluensi 80% (Perbesaran 40x), (B) Gambaran desposisi kalsium dengan pewarnaan Alizarin Red (perbesaran 400x), dan (C) Gambaran desposisi lemak dengan pewarnaan Oil Red O (perbesaran 400x).

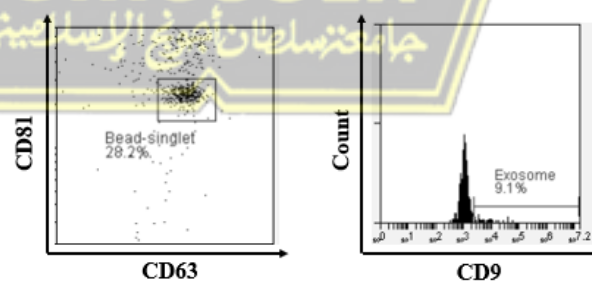
Hasil isolasi MSCs divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Hasil secara kuantitatif berupa

persentase ekspresi positif CD 90.1 (99,8%), CD 29 (97,7%), dan ekspresi negatif dari CD 45 (1,9%), dan CD 31 (3,7%) (Gambar 5.3).



**Gambar 5.3.** Ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31 pada MSCs

Medium MSCs yang diduga berisi eksosom dilakukan filtrasi menggunakan teknik *Tangential Flow Filtration* (TFF), lalu persentase eksosom dianalisis menggunakan metode *Flow Cytometry*. Hasil analisis menunjukkan bahwa teknik filtrasi berhasil mengisolasi eksosom sebesar 9.1% dengan nilai MFI rata-rata 1056.35 dan nilai kadar eksosom rata-rata adalah 960 ng/mL (Gambar 5.4).



**Gambar 5.4.** Validasi Eksosom

### 5.1.2. Efek Pemberian EH-MSCs terhadap Kadar MDA

Penelitian *Exosome Hypoxia Mesencymal Stem Cell* (EH-MSCs) terhadap kadar MDA dan MMP-1 Tikus Galur Wistar yang di

induksi paparan sinar UVB telah dilakukan selama 14 hari. Hasil penelitian tersebut tertera pada tabel 5.1.

**Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Kadar MDA dan MMP-1**

| Variabel                  | Kelompok                                                   |           |           |           |           | Sig.(p)  |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
|                           | K1<br>N=6                                                  | K2<br>N=6 | K3<br>N=6 | K4<br>N=6 | K5<br>N=6 |          |
| <b>Ekspresi Gen MDA</b>   |                                                            |           |           |           |           |          |
| Mean                      | 196,58                                                     | 686,58    | 543,25    | 368,33    | 329,33    |          |
| Std.deviasi               | 64,11                                                      | 119,01    | 120,31    | 59,67     | 82,06     |          |
| Shapiro Wilk              | 0,875*                                                     | 0,482*    | 0,444*    | 0,503*    | 0,659*    |          |
| Levene test               |                                                            |           |           |           |           | 0,101**  |
| One Way ANOVA             |                                                            |           |           |           |           | 0.000*** |
| <b>Ekspresi Gen MMP-1</b> |                                                            |           |           |           |           |          |
| Mean                      | 0,06                                                       | 0,33      | 0,09      | 0,08      | 0,07      |          |
| Std.deviasi               | 0,03                                                       | 0,06      | 0,05      | 0,04      | 0,04      |          |
| Shapiro Wilk              | 0,517*                                                     | 0,986*    | 0,482*    | 0,946*    | 0,151*    |          |
| Levene test               |                                                            |           |           |           |           | 0,591**  |
| One Way ANOVA             |                                                            |           |           |           |           | 0.000*** |
| <b>Keterangan:</b>        | *Normal p>0,05    **Homogen p>0,05    ***Signifikan p<0,05 |           |           |           |           |          |

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi MDA terendah yaitu pada kelompok tikus sehat yang mendapatkan NaCl 0,9% 200uL (K1), kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan (K5) tikus dipapar UVB diberi perlakuan EH-MSCs 300uL secara subkutan, dan kelompok perlakuan (K4) tikus dipapar UVB diberi perlakuan EH-MSCs 200uL secara subkutan. Rerata ekspresi MDA tertinggi adalah kelompok perlakuan (K2) Tikus dipapar UVB dan tidak diberi perlakuan apapun, selanjutnya kelompok perlakuan (K3) tikus dipapar UVB diberi perlakuan HA 200uL secara subkutan. Seluruh

kelompok kadar MDA berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai  $p\text{-value} > 0,05$  dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* hasilnya homogen nilai  $p\text{-value} (p > 0,05)$  maka analisis data menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai  $p\text{value} 0,000 (p < 0.05)$ , kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

Rerata kadar MMP-1 terendah yaitu pada kelompok tikus sehat yang diberikan NaCl 0,9% 200uL (K1), kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan (K5) tikus dipapar UVB diberi perlakuan EH-MSCs 300uL dan diikuti oleh kelompok perlakuan (K4) Tikus dipapar UVB diberi perlakuan EH-MSCs 200uL secara subkutan. Rerata ekspresi gen MMP-1 tertinggi adalah kelompok (K2) Tikus dipapar UVB dan tidak diberi perlakuan apapun dan diikuti kelompok perlakuan (K3) tikus dipapar UVB diberi perlakuan HA 200uL. Seluruh kelompok ekspresi gen MMP-1 berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai  $p\text{-value} > 0,05$  dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* hasilnya homogen nilai  $p\text{-value} (p > 0,05)$  maka analisis data menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai



pvalue 0,000 ( $p < 0.05$ ), kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* *LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

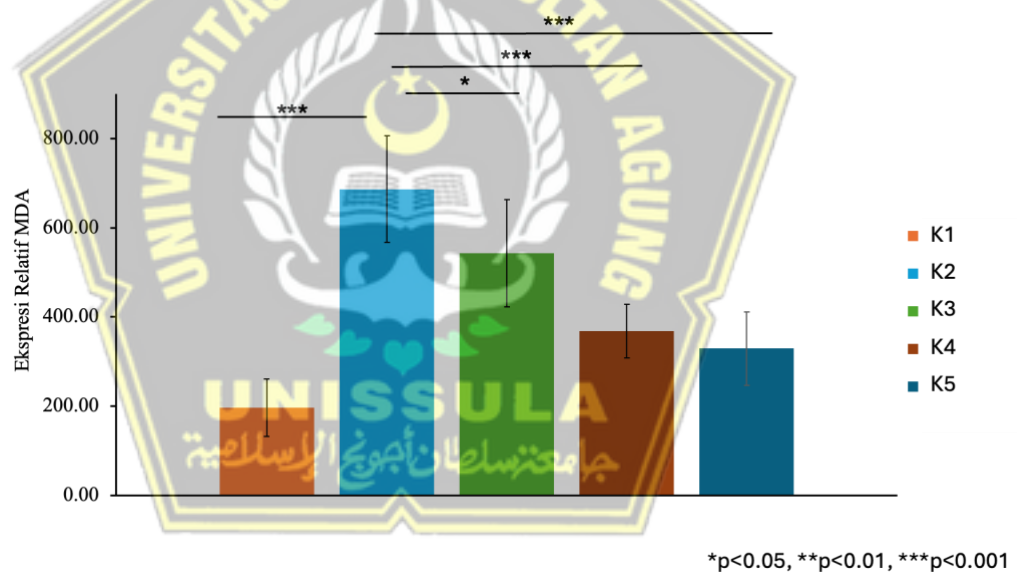
**Tabel 5.2. Perbedaan Kadar MDA Antar 2 Kelompok**

| Kelompok | <i>p-Value</i> |
|----------|----------------|
| K1 vs K2 | 0,000*         |
| K1 vs K3 | 0,000*         |
| K1 vs K4 | 0,004*         |
| K1 vs K5 | 0,020*         |
| K2 vs K3 | 0,013*         |
| K2 vs K4 | 0,000*         |
| K2 vs K5 | 0,000*         |
| K3 vs K4 | 0,003*         |
| K3 vs K5 | 0,001*         |
| K4 vs K5 | 0,473          |

\**Uji Post hoc LSD dengan nilai signifikan  $p < 0.05$*

Hasil uji *post hoc LSD* kadar MDA pada tabel 5.2 menunjukkan kadar MDA pada kelompok Tikus sehat diberi perlakuan NaCl 0,9% (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UVB tanpa diberi perlakuan apapun (K2), juga berbeda secara signifikan dengan semua kelompok perlakuan baik kontrol positif (K3) maupun dengan perlakuan EH-MSCs 200uL (K4) dan EH-MSCs 300uL (K5) dengan nilai  $p < 0,05$ . Kemudian kelompok Tikus dipapar UVB tanpa diberi perlakuan (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok tikus dipapar UVB diberi EH-MSCs dosis 200uL secara subkutan (K4) dengan nilai  $p$ -value 0,000 ( $p < 0.05$ ) dan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok Tikus dipapar UVB diberi perlakuan EH-MSCs dosis 300uL secara subkutan (K5) dengan nilai  $p$ -value 0,000 ( $p < 0,05$ ), serta juga berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol

positif (K3) yang diberi perlakuan HA 200uL dengan nilai  $p$  0,013 ( $p < 0,05$ ). Perlakuan kelompok kontrol positif K3 juga berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan EH-MSCs 200uL dan 300uL dengan nilai  $p < 0,05$ . Tikus kelompok perlakuan K4 dan K5 tidak berbeda signifikan yang ditandai dengan nilai  $p > 0,05$  (0,473). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian E-MSCs dosis 200 $\mu$ L dan 300 $\mu$ L berpengaruh secara signifikan terhadap kadar MDA pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



**Gambar 5.5.** Ekspresi Relatif mRNA MDA, tabel ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model  $\pm$  SD

### 5.1.3. Efek Pemberian EH-MSCs terhadap Kadar MMP-1

Rerata kadar MMP-1 setelah analisis uji post hoc LSD di sajikan pada tabel 5.3.



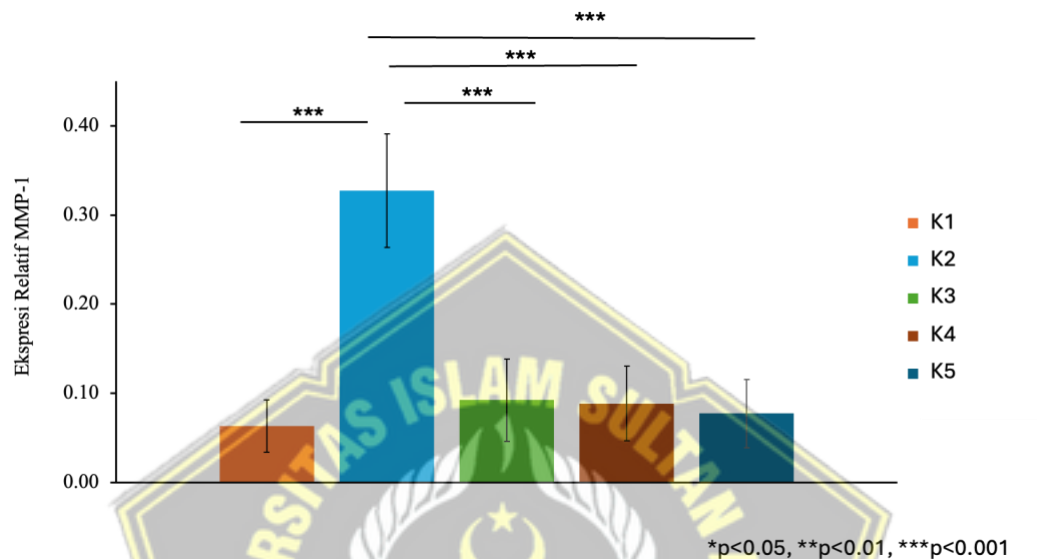
**Tabel 5.3. Perbedaan Kadar MMP-1 Antar 2 Kelompok**

| <b>Kelompok</b> | <b><i>p-Value</i></b> |
|-----------------|-----------------------|
| K1 vs K2        | 0,000*                |
| K1 vs K3        | 0,278                 |
| K1 vs K4        | 0,345                 |
| K1 vs K5        | 0,600                 |
| K2 vs K3        | 0,000*                |
| K2 vs K4        | 0,000*                |
| K2 vs K5        | 0,000*                |
| K3 vs K4        | 0,885                 |
| K3 vs K5        | 0,569                 |
| K4 vs K5        | 0,670                 |

*\*Uji Post hoc LSD dengan nilai signifikan  $p < 0.05$*

Hasil uji *post hoc* LSD pada tabel 5.3 menunjukkan ekspresi gen MMP-1 pada kelompok tikus sehat yang diberi perlakuan NaCl 0,9% (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Tikus dipapar UVB tanpa perlakuan (K2) dengan nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), namun tidak berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol positif (K3) yang diberi perlakuan HA 200uL, kelompok perlakuan (K4) EH-MSCs 200uL, dan kelompok (K5) EH-MSCs 300uL. Kelompok kontrol negatif (K2) berbeda secara signifikan terhadap semua kelompok dengan nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ). Kelompok kontrol positif (K3) tidak berbeda signifikan terhadap kelompok yang diberi EH-MSCs dosis 200uL secara subkutan (K4) nilai  $p$ -value 0,885 ( $p > 0.05$ ) dan kelompok tikus dipapar UVB diberi E-MSCs dosis 300uL secara subkutan (K5) nilai  $p$ -value 0,569 ( $p > 0.05$ ). Tikus kelompok perlakuan K4 dan K5 tidak berbeda signifikan yang ditandai dengan nilai  $p > 0,05$  (0,760). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian EH-MSCs dosis 200uL

dan 300 $\mu$ L berpengaruh secara signifikan terhadap kadar MMP-1 pada tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



**Gambar 5.6.** Ekspresi Relatif mRNA MMP-1, tabel ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model  $\pm$  SD

## 5.2. Pembahasan

Radiasi sinar UVB merupakan penyebab utama berkurangnya kolagen kulit yang ditandai dengan kondisi stress oksidatif yang berlebihan<sup>80</sup>. Respon stress oksidatif yang diinduksi UVB mengaktifasi jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B di epidermis yang berdampak pada penekanan sitokin anti inflammasi seperti IL-10 sehingga menginduksi berbagai jalur, salah satunya produksi enzim MMP-1<sup>81,82</sup>. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa peningkatan ROS akan mengaktifkan MDA sehingga akan menginduksi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan melepaskan sitokin proinflamasi yang berperan penting dalam *maintance* dan ekspansi proses berkurangnya kolagen pada

kulit<sup>83,84</sup>. Hal ini mengesankan bahwa penekanan MDA dan MMP-1 diharapkan dapat menekan proses *collagen loss* yang diinduksi radiasi sinar UVB.

Peningkatan kadar ROS akibat paparan sinar UVB menginduksi ekspresi sirtuins 1 (Sirt1) yang akan mengaktifkan protein PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). Aktivasi PGC-1 $\alpha$  menginduksi ubiquitinasi kelch-like ECH-associated protein 1 (Kaep1), jika Kaep1 terekspresi maka akan menekan ekspresi enzim antioksidan yang menyebabkan MDA terekspresi tinggi<sup>77</sup>. Degradasi kolagen adalah perubahan merusak utama yang diamati pada kulit yang menua. Degradasi kolagen diperburuk oleh aktivasi matriks metalloproteinase (MMP). Nrf2 adalah faktor transkripsi utama untuk regulator antioksidan seluler, yang mengikat elemen respons antioksidan dan memainkan peran penting dalam kerusakan fotooksidatif melalui pengurangan ekspresi MMP-1. Ekspresi Nrf2 juga telah terbukti mempengaruhi perbaikan luka kulit pada tikus dengan meningkatkan transkripsi COL1A1<sup>78</sup>.

Hasil analisis menunjukkan bahwa EH-MSCs dosis 300 $\mu$ l mampu secara signifikan menurunkan ekspresi MDA. Hal ini diduga karena EH-MSCs dapat menginduksi berbagai enzim antioksidan, seperti etc, dan mengandung molekul anti-inflamasi untuk menghambat ROS dan akhirnya berdampak pada penurunan MDA. Regulasi keseimbangan antara level ROS dan antioksidan sangat penting dalam beberapa jalur transduksi sinyal seluler di antaranya pengaturan sintesis kolagen<sup>89</sup>. MDA dapat menghambat

respirasi mitokondria, menyebabkan disfungsi mitokondria, dan memiliki efek toksik pada enzim tertentu, yang dapat berdampak pada pembentukan ROS<sup>90,91</sup>. Hasil pada penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menjelaskan bahwa MSCs resisten terhadap rangsangan oksidatif dan nitrosatif *in vitro* yang berhubungan dengan enzim antioksidan yang diekspresikan secara konstitutif SOD1, SOD2, katalase (CAT) dan glutathion peroksidase tingkat tinggi sehingga dapat menurunkan kadar MDA<sup>79</sup>. Secara spesifik, EH-MSCs yang diproduksi oleh MSCs yang hipoksia mengandung mengandung berbagai senyawa seperti *growth factors transforming growth factor-β* (TGF-β), *platelet-derived growth factors* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF), dan *hepatocyte growth factor* (HGF), disamping itu juga mengandung sitokin antiinflamasi IL-10, Lipid, mRNA, miRNA, dan mtRNA yang mampu meningkatkan SOD, melalui jalur Nrf2 sehingga dapat menekan MDA<sup>80,81</sup>.

Aktivasi jalur Nrf2, exosome yang diturunkan dari MSC dapat meningkatkan ekspresi dan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, yang secara efektif dapat menetralkan dan mengais ROS, sehingga mengurangi stres oksidatif MDA. MDA yang netral menyebabkan penurunan MMP-1 sehingga kolagen tidak terdegradasi<sup>81,82</sup>. Studi menunjukkan bahwa SOD berinteraksi dengan kolagen tipe I dan tipe IV melalui domain pengikatan matriks sehingga demikian melindungi mereka dari kerusakan oksidatif dan menghambat cedera yang dimediasi kolagen. Demikian pula, tingkat ekspresi MMP-1 yang diinduksi UVB ditemukan berkurang pada tikus

transgenik SOD-overexpressing dibandingkan dengan tikus tipe liar (WT). Dengan demikian, SOD dapat memainkan peran penting dalam mengatur penuaan kulit<sup>83</sup>. Hasil analisis menunjukkan bahwa EH-MSCs dosis 300 $\mu$ l juga mampu secara signifikan menurunkan kadar MMP-1. EH-MSCs mensekresikan vesikel ekstraseluler yang mengandung berbagai macam molekul antiinflamasi dan antioksidan, seperti IL-10, TGF $\beta$ , GPX, superoxide dismutase (SOD)1, SOD2, catalase (CAT) dan sirtuin (SIRT)1 dan 3<sup>61</sup>. Molekul anti-inflamasi dalam EH-MSCs dapat menghambat faktor transkripsi NF $\kappa$ B yang merupakan pemicu overekspresi ROS dan MMP-1<sup>85</sup>. Temuan ini menunjukkan bahwa menekan MMP-1 bisa menjadi strategi terapi yang menjanjikan untuk mencegah degradasi kolagen akibat paparan UVB.

Keterbatasan pada penelitian ini tidak melakukan analisa efek EH-MSCs terhadap kadar stress oksidatif (ROS) yang merupakan pemicu utama terjadinya kolagen loss. Disamping itu penelitian ini juga tidak menganalisis pada jalur transkripsi MDA dan MMP-1 melalui NF-KB. Penelitian ini juga belum menganalisis downstream pathway NF-kB yang terkait dengan regulator MMP-1 yaitu PI3K dan MAPK.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian EH-MSC terhadap kadar MMP1 dan MDA yang diinduksi sinar UVB pada tikus galur wistar.
2. Terdapat perbedaan kadar MMP-1 pada tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UVB yang diberikan injeksi EH MSC 200 dan 300 dibandingkan kontrol dengan  $p\text{-value} < 0,05$ .
3. Terdapat perbedaan kadar MDA pada tikus galur Wistar yang diinduksi sinar UVB yang diberikan injeksi EH MSC 200 dan 300 dibandingkan kontrol dengan  $p\text{-value} < 0,05$ .

#### 6.2. Saran

1. Diharapkan studi yang akan datang dapat menganalisis *pathway* utama mengenai bagaimana EH-MSCs mampu menghambat *Reactive Oxygen Species* (ROS), apakah melalui *pathway* Sirt1/PGC1a, PI3K/Akt/MAPK, atau NF $\kappa$ B.
2. Pada penelitian ini sudah menunjukkan hasil yang positif pada hewan model, diharapkan penelitian selanjutnya bisa dilakukan penelitian klinis selanjutnya ke *human* untuk mengetahui efektifitasnya dan efek yang ditimbulkan.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain* (United Kingdom) 2019; 23: 874–883.
2. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in *Photoaging* and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; 17.
3. Hwang BM, Noh EM, Kim JS, Kim JM, Hwang JK, Kim HK et al. Decursin inhibits UVB-induced MMP expression in human dermal fibroblasts via regulation of nuclear factor- $\kappa$ B. *Int J Mol Med* 2013; 31: 477–483.
4. Wen KC, Fan PC, Tsai SY, Shih IC, Chiang HM. *Ixora parviflora* protects against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs, MAP kinases, and COX-2 and by promoting type I procollagen synthesis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012.
5. Gromkowska-Kępa KJ, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, Socha K. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging - review of in vitro studies. *J Cosmet Dermatol* 2021;20(11):3427-3431.
6. Jablonski, N. G., & Chaplin, G. Human skin pigmentation, migration and disease susceptibility. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2012, 367(1590), 785–792.
7. Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation, migration and disease susceptibility. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Mar; 367(1590):785-92.
8. Gupta A, Kaur CD, Jangdey M, Saraf S. Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy. *Ageing Res Rev* 2014; 13: 65–74.
9. Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation, migration and disease susceptibility. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012;367(1590):785-92.



10. Eleni P, Michael R, George K. Hyaluronic acid: a key molecule in skin aging. *Dermato Endocrinology*. 2012.
11. Ciężyńska M, Olejniczak-Staruch I, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. Ultraviolet Radiation and Chronic Inflammation-Molecules and Mechanisms Involved in Skin Carcinogenesis: A Narrative Review. *Life*. 2021;11(4):326.
12. He X, Dong Z, Cao Y, Wang H, Liu S, Liao L et al. MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing. 2019.
13. Xiong Y, Xiong Y, Zhang H, Zhao Y, Han K, Zhang J, Zhao D, Yu Z, Geng Z, Wang L, Wang Y, Luan X. hPMSCs-Derived Exosomal miRNA-21 Protects Against Aging-Related Oxidative Damage of CD4<sup>+</sup> T Cells by Targeting the PTEN/PI3K-Nrf2 Axis. *Front Immunol*. 2021;12:780897.
14. Gao W, Wang X, Si Y, Pang J, Liu H, Li S, Ding Q, Wang Y. Exosome Derived from ADSCs Attenuates Ultraviolet B-mediated Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Photochem Photobiol*. 2021 Jul;97(4):795-804.
15. Hwang E, Park SY, Lee HJ, Lee TY, Sun ZW, Yi TH. Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice. *Phytother Res*. 2014 Dec;28(12):1778-88.
16. Yan T, Huang L, Yan Y, Zhong Y, Xie H, Wang X. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome miR-29b-3p alleviates UV irradiation-induced photoaging in skin fibroblast. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2023 May;39(3):235-245.
17. Putra A, Alif I, Hamra N, Santosa O, Kustiyah AR, Muhar AM, Lukman K. MSC-released TGF- $\beta$  regulate  $\alpha$ -SMA expression of myofibroblast during wound healing. *J Stem Cells Regen Med*. 2020 Dec;16(2):73-79.
18. Guan L, Suggs A, Galan E, Lam M, Baron ED. Topical application of ST266 reduces UV-induced skin damage. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017 Nov;10:459-471.
19. Pittayapruek P, Meephanan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; 17.

20. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC et al. Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor  $\kappa$ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research* 2012; 32: 428–438.
21. Jung SK, Lee KW, Kim HY, Oh MH, Byun S, Lim SH et al. Myricetin suppresses UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by inhibiting Raf. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 1455–1461.
22. Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S et al. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med* 2012; 33: 119–208.
23. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 31–43.
24. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S et al. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Archives of Dermatology*, 138(11) | 10.1001/archderm.138.11.1462. 2002; 138.
25. Wang F, Garza LA, Cho S, Kafi R, Hammerberg C, Quan T et al. Effect of increased pigmentation on the antifibrotic response of human skin to UV-A1 phototherapy. *Arch Dermatol* 2008; 144: 851–858.
26. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A et al. Matrix metalloproteinases: A review. 1993
27. Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO Journal* 1990; 9: 2241–2246.
28. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993; 53: 288–295.
29. Hwang BM, Noh EM, Kim JS, Kim JM, Hwang JK, Kim HK et al. Decursin inhibits UVB-induced MMP expression in human dermal fibroblasts via regulation of nuclear factor- $\kappa$ B. *Int J Mol Med* 2013; 31: 477–483.

30. Wen KC, Fan PC, Tsai SY, Shih IC, Chiang HM. *Ixora parviflora* protects against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs, MAP kinases, and COX-2 and by promoting type I procollagen synthesis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012.
31. Tewari A, Grys K, Kollet J, Sarkany R, Young AR. Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: Potential implications for photoaging. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014.
32. Parkinson LG, Toro A, Zhao H, Brown K, Tebbutt SJ, Granville DJ. Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation. *Aging Cell* 2015.
33. Steinbrenner H, Ramos MC, Stuhlmann D, Sies H, Brenneisen P. UVA-mediated downregulation of MMP-2 and MMP-9 in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 486–491.
34. Chiang HM, Chen HC, Chiu HH, Chen CW, Wang SM, Wen KC. *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after uvb exposure via ROS scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.
35. Hwang E, Lee DG, Park SH, Oh MS, Kim SY. Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type I and MMP-1 expression. *J Med Food* 2014; 17: 985–995.
36. Sun ZW, Hwang E, Lee HJ, Lee TY, Song HG, Park SY et al. Effects of *Galla chinensis* extracts on UVB-irradiated MMP-1 production in hairless mice. *J Nat Med* 2015; 69: 22–34.
37. Vicentini FTMC, He T, Shao Y, Fonseca MJV, Verri WA, Fisher GJ et al. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- $\kappa$ B pathway. *J Dermatol Sci* 2011; 61: 162–168.

38. Park JE, Pyun HB, Woo SW, Jeong JH, Hwang JK. The protective effect of kaempferia parviflora extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2014; 30: 237–245.
39. Son WC, Yun JW, Kim BH. Adipose-derived mesenchymal stem cells reduce MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts: Therapeutic potential in skin wrinkling. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015; 79: 919–925.
40. Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, Novotný J, Kolář M, Lacina L et al. Interleukin-6: Molecule in the intersection of cancer, ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1–25.
41. Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ, Chiang HM. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3 $\beta$ -ol, Isolated from *Antrodia camphorata*, on Hairless mouse skin. *Molecules* 2016; 21: 1–14.
42. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; 11.
43. Cherian DA, Peter T, Narayanan A, Madhavan SS, Achammada S, Vynat GP. Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in Periodontitis Patients. *J Pharm Bioallied Sci.* 2019 May;11(Suppl 2):S297-S300.
44. Cordiano R, Di Gioacchino M, Mangifesta R, Panzera C, Gangemi S, Minciullo PL. Malondialdehyde as a Potential Oxidative Stress Marker for Allergy-Oriented Diseases: An Update. *Molecules.* 2023 Aug;28(16):5979.
45. Morales M, Munné-Bosch S. Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiol.* 2019 Jul;180(3):1246-1250.
46. Papaccio F, D Arino A, Caputo S, Bellei B. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants (Basel).* 2022 Jun;11(6):1121.
47. Dharmajaya R, Sari DK. Malondialdehyde value as radical oxidative marker and endogenous antioxidant value analysis in brain tumor. *Ann Med Surg (Lond).* 2022 Mar;77:103231.

48. Mao C, Yuan JQ, Lv YB, Gao X, Yin ZX, Kraus VB, Luo JS, Chei CL, Matchar DB, Zeng Y, Shi XM. Associations between superoxide dismutase, malondialdehyde and all-cause mortality in older adults: a community-based cohort study. *BMC Geriatr*. 2019 Apr;19(1):104.
49. Paculová V, Prasad A, Sedlářová M, Pospíšil P. Oxidative modification of collagen by malondialdehyde in porcine skin. *Arch Biochem Biophys*. 2024 Feb;752:109850.
50. Negre-Salvayre A, Salvayre R. Post-Translational Modifications Evoked by Reactive Carbonyl Species in Ultraviolet-A-Exposed Skin: Implication in Fibroblast Senescence and Skin Photoaging. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Nov 18;11(11):2281.
51. Yadav UC, Ramana KV. Regulation of NF- $\kappa$ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:690545.
52. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells* 2019; 12: 218–226.
53. Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems* 2018.
54. Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. 2011.
55. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. 2019; 38: 164–171.
56. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 2019; 10: 1–10.
57. Naguib YW, Cui Z. *Nanomedicine : The Promise*. 2014; 135–156.



58. Múzes G, Sipos F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Cells*. 2022 Jul 26;11(15):2300.
59. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2020 Dec 26;12(12):1529-1552.
60. Xia C, Dai Z, Jin Y, Chen P. Emerging Antioxidant Paradigm of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Nov 29;12:727272.
61. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, Xu C, Chen X, Huang Y, Zhu Z, Huang X, Han X, Xie N, Ren G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*. 2010 May;20(5):510-8.
62. Xiong Y, Xiong Y, Zhang H, Zhao Y, Han K, Zhang J, Zhao D, Yu Z, Geng Z, Wang L, Wang Y, Luan X. hPMSCs-Derived Exosomal miRNA-21 Protects Against Aging-Related Oxidative Damage of CD4<sup>+</sup> T Cells by Targeting the PTEN/PI3K-Nrf2 Axis. *Front Immunol*. 2021 Nov 23;12:780897.
63. Oveili E, Vafaei S, Bazavar H, Eslami Y, Mamaghanizadeh E, Yasamineh S, Gholizadeh O. The potential use of mesenchymal stem cells-derived exosomes as microRNAs delivery systems in different diseases. *Cell Commun Signal*. 2023 Jan 23;21(1):20.
64. Song L, Dong W, Gao M, Li J, Hu M, Guo N, et al. A novel role of IKK $\alpha$  in the mediation of UVB-induced G0/G1 cell cycle arrest response by suppressing Cyclin D1 expression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2010;
65. Clark RAF, An JQ, Greiling D, Khan A, Schwarzbauer JE. Fibroblast Migration on Fibronectin Requires Three Distinct Functional Domains. *J Invest Dermatol*. 2003;

66. Putra A, Alif I, Hamra N, Santosa O, Kustiyah AR, Muhar AM, et al. Msc-released  $\text{tgf-}\beta$  regulate  $\alpha$ -sma expression of myofibroblast during wound healing. *J Stem Cells Regen Med*. 2020;
67. Ding H, Chen J, Qin J, Chen R, Yi Z. TGF- $\beta$ -induced  $\alpha$ -SMA expression is mediated by C/EBP $\beta$  acetylation in human alveolar epithelial cells. *Mol Med*. 2021;
68. Abdel-Rahman RF, Fayed HM, Asaad GF, Ogaly HA, Hessin AF, Salama AAA, et al. The involvement of TGF- $\beta$ 1 /FAK/ $\alpha$ -SMA pathway in the antifibrotic impact of rice bran oil on thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *PLoS One*. 2021;
69. Lei BK, Zhao S, Xu T, Zhou Y, Xu SS, Wang RY, et al. TGF- $\beta$ 1/ERK/CTGF pathway involved in effect of acupuncture on exercise-induced skeletal muscle fibrosis. *Zhen ci yan jiu = Acupunct Res*. 2021;
70. Hough C, Radu M, Doré JJE. TGF-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS One*. 2012;
71. Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; 15: 240.
72. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 929–958.
73. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SEG, Kang S, Fisher GJ et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *American Journal of Pathology* 2006; 168: 1861–1868.
74. Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81: 6098–6107.
75. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; 2: 5–10.
76. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC et al. Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor  $\kappa$ B/activator



- protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research* 2012; 32: 428–438.
77. Fernandez F. BIOSYNTHESIS OF COLLAGEN Biochemical and Physicochemical Characterization of Collagen-Synthesizing Polyribosomes Preparation of the Ribosomal Suspension. *J Cell Biol* 1967; 33: 27–42.
  78. Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM. Hijacking of the AP-1 signaling pathway during development of ATL. *Front Microbiol* 2018; 8: 1–13.
  79. Zhang H. p53 plays a central role in UVA and UVB induced cell damage and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Lett.* 2006 Dec 8;244(2):229-38.
  80. Kumar A, Kaur S, Dhiman S, Singh PP, Bhatia G, Thakur S, Tuli HS, Sharma U, Kumar S, Almutary AG, Alnuqaydan AM, Hussain A, Haque S, Dhama K, Kaur S. Targeting Akt/NF- $\kappa$ B/p53 Pathway and Apoptosis Inducing Potential of 1,2-Benzenedicarboxylic Acid, Bis (2-Methyl Propyl) Ester Isolated from *Onosma bracteata* Wall. against Human Osteosarcoma (MG-63) Cells. *Molecules.* 2022 May 28;27(11):3478.
  81. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009 May 15;284(20):13291-5.