

**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME MESENCHYMAL STEM*
CELL HYPOXIA (EH-MSCS) GLUTATHIONE DAN
VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI TGF- β DAN MITF
(Studi Eksperimental *in vivo* Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi)**

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2



Vera Wahyuningtyas

MBK 222010336

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2025**

**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME MESENCHYMAL STEM*
CELL HYPOXIA (EH-MSCS) GLUTATHIONE DAN
VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI TGF- β DAN MITF
(Studi Eksperimental *in vivo* Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi)**

Disusun oleh:
Vera Wahyuningtias
(MBK 222010336)

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
04 Februari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B
NIK. 210 113 160

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



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B., FINACS
NIK 210 113 160

PERNYATAAN

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

Semarang, 4 Februari 2025



(Vera Wahyuningtias)

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan atas berkat-Nya, sehingga tesis dengan judul, “PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL HYPOXIA* (EH-MSCS) GLUTATHIONE DAN VITAMIN C TERHADAP EKSPRESI TGF- β DAN MITF (Studi Eksperimental *in vivo* Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi)” ini dapat terselesaikan. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam- dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum, Rektor Universitas Islam Sultan Agung, dan seluruh wakil rektor atas kesempatan untuk mengejar dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp. KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Masgister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Pembimbing I yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya tesis ini.
4. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B selaku dosen pembimbing II yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya tesis ini.
5. Prof. Dr. dr. Delfitri Munir, Sp.THT-KL (K); Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes; Dr. dr. Chodidjah, M. Kes; selaku dosen penguji I, II dan III yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini lebih baik.

6. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
7. Suami tercinta dr. Delta Darussalam Effendy, Sp. OT, K. Spine yang selalu mensupport. Terimakasih untuk selalu ada dan mendukung disaat saya butuhkan. Serta anak kebanggaan mami: Cattlea Haneen Effendy; karena dukungan kalian lah, mami bisa berjuang sejauh ini. Semoga kelak kalian bisa meraih cita- cita lebih dari yang mami sudah capai saat ini.
8. Seluruh keluarga besar Vende Aesthetic Clinic yang selalu menyemangati. Terimakasih atas dukungan kalian.
9. Segenap staff SCCR (*Stem Cell Cancer Research*) Fakultas Kedokteran Unissula, kalian sudah seperti keluarga kedua saya... Terimakasih atas bantuannya.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, Desember 2024



Vera Wahyuningtias

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Umum.....	4
1.3.2. Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Teoritis.....	5
1.4.2. Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Transforming Growth Factor- β (TGF- β)	7
2.2. <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i> (MITF)	9
2.3. Hiperpigmentasi.....	12
2.4. <i>Mesenchymal stem cells</i> (MSCs)	14
2.4.1. Fungsi	15
2.4.2. Mobilisasi Msc	16
2.4.3. Konsep Small Molecule Growth Factor MSC.....	17

2.4.4. Induksi Small Molecule dan Exosome MSC.....	18
2.5. Injeksi Glutathione dengan Vitamin C.....	19
2.6. Pengaruh Exosome dan Glutathione dengan Vitamin C terhadap ekspresi gen TGF-B dan MITF	22
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	25
3.1. Kerangka Teori	25
3.2. Kerangka Konsep.....	28
3.3. Hipotesis	28
BAB IV METODE PENELITIAN	29
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	29
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	30
4.2.1. Variabel Penelitian	30
4.2.2. Definisi Operasional.....	30
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	32
4.3.1. Subjek Penelitian.....	32
4.3.2. Sampel Penelitian	32
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	33
4.3.4. Besar Sampel	34
4.4. Alat dan Bahan.....	34
4.4.1. Alat	34
4.4.2. Bahan.....	35
4.5. Cara Penelitian	35
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	35
4.5.2. Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	35
4.5.3. Penetapan Dosis.....	36
4.5.4. Paparan UV-B	37
4.5.5. Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Jaringan	38
4.5.6 Analisis pewarnaan Masson Fontana untuk Pengecekan Kadar Melanin.....	38

4.7.8 Analisis Ekspresi TGF- β dan MITF Menggunakan Metode RTq-PCR.....	39
4.6 Alur Penelitian.....	41
4.7 Tempat dan Waktu Penelitian	42
4.8 Analisa Data	42
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
5.1 HASIL PENELITIAN	43
5.1.1 Validasi <i>exosome mesenchymal stem cell hypoxia</i> (EH-MSD).....	43
5.1.2 Validasi jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi	46
5.1.3 Hasil gambaran makroskopis jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi setelah perlakuan	47
5.1.4 Efek injeksi <i>exosome mesenchymal stem cell hypoxia</i> (EH-MSD) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen TGF- β	48
5.1.5 Efek injeksi <i>exosome mesenchymal stem cell hypoxia</i> (EH-MSD) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi MITF	51
5.2 PEMBAHASAN	53
BAB VI KESIMPULAN	61
6.1 Kesimpulan.....	61
6.2 Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN.....	72
Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	72
Lampiran 2. Statistik ekspresi gen TGF- β dan MITF	73
Lampiran 3. Dokumentasi penelitian kulit mencit	82
Lampiran 4. Dokumentasi kegiatan penelitian.....	83

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5.1 Uji Mann Whitney ekspresi TGF- β pada masing-masing kelompok ...	50
Tabel 5.2 Uji Post Hoc Tamhane MITF pada masing-masing kelompok	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Kemampuan Diferensiasi dari MSC.	14
Gambar 2.2. Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC.	18
Gambar 3.1 Kerangka Teori.....	27
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	28
Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian.....	29
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	41
Gambar 5.1 Hasil kultur MSCs sel berbentuk spindle-like dengan pembesaran 100x.	44
Gambar 5.2 Validasi exosome terhadap ekspresi marker CD81, CD63 dan CD9.44	
Gambar 5.3 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit (kiri) dan (kanan) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan <i>alizarin red</i> dan <i>oil red</i> pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah orange).....	45
Gambar 5.4 (A) Jaringan kulit tanpa paparan UVB, (B) Jaringan kulit yang dipapar UVB, (C) Histologi jaringan kulit tanpa paparan UVB, (D) Histologi jaringan kulit yang dipaparan UVB.	46
Gambar 5.5 Gambaran makroskopis setiap kelompok pada jaringan kulit mencit setelah perlakuan.....	47
Gambar 5.6 Grafik ekspresi TGF- β pada tiap kelompok perlakuan.....	50
Gambar 5.7 Grafik ekspresi MITF pada tiap kelompok penelitian	52

DAFTAR SINGKATAN

AA	: <i>Asam Askorbat</i>
AP-1	: <i>Activator protein 1</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
cAMP	: <i>Cyclic adenosida monofosfat</i>
DAMP	: <i>Damage-associated molecular patterns</i>
CD	: <i>Cluster Of Differntiation</i>
EPO	: <i>Erythrooietin</i>
EH-MSCs	: <i>Exosome hypoxia mesenchymal stem cells</i>
GSH	: <i>Gluthatione</i>
GCSF	: <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
HLA-DR	: <i>Human leukocyt antigens- isotipe DR</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
MAPK	: <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MED	: <i>Minimal erythema dose</i>
MITF	: <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
NF- $\kappa\beta$	: <i>Nuclear factor-kappa β</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PIGF	: <i>Placental growth factor</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SDF- 1	: <i>Stromal-derived factor-1</i>
STAT3	: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SIRT	: <i>Sirtuin</i>
SCF	: <i>Stem cell factor</i>
SOD	: <i>Superoksida dismutase</i>
TGF- β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF α	: <i>Tumor necrosis factor α</i>
TRAF1	: <i>TNF receptor-associated factor 1</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

ABSTRAK

Latar Belakang: Hiperpigmentasi merupakan kondisi kulit yang terjadi sebagai akibat dari paparan sinar UVB yang dapat menyebabkan berbagai kerusakan pada kulit seperti kemerahan, pengerasan, penumpukan melanin, penuaan kulit, dan bahkan kanker. TGF- β dapat menghambat akumulasi melanin melalui penurunan regulasi MITF. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen TGF- β dan MITF mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

Metode: Penelitian ini merupakan eksperimen in vivo dengan desain post-test only control group design, menggunakan 30 mencit jantan C57BL/6 yang dibagi dalam 5 kelompok: mencit sehat (K1), mencit dengan paparan UVB (K2), injeksi glutathione dan vitamin C (K3), injeksi exosome (K4), serta injeksi kombinasi exosome, glutathione, dan vitamin C (K5). Ekspresi gen TGF- β dan MITF dianalisis menggunakan RT-qPCR.

Hasil: Analisis ekspresi gen TGF- β menunjukkan perbedaan signifikan antar semua kelompok dengan uji *Kruskal Wallis* p 0,011 ($p < 0,05$), rata-rata ekspresi terendah terdapat pada kelompok K5 $1,00 \pm 0,20$ dan paling tinggi pada kelompok K2 $2,72 \pm 0,64$, sedangkan rata rata ekspresi MITF paling tinggi terdapat pada kelompok K4 $1,28 \pm 0,97$, dan terendah pada kelompok K3 $0,36 \pm 0,17$, terdapat perbedaan signifikan diantara semua kelompok penelitian dengan uji *One Way Anova* didapatkan nilai p 0,035 ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Pemberian injeksi EH-MSC dan glutathione dengan vitamin C berpengaruh terhadap ekspresi gen TGF- β dan MITF mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

Kata Kunci: Hiperpigmentasi, Injeksi EH-MSC, ekspresi TGF- β , MITF.

ABSTRACT

Background: Hyperpigmentation is a skin condition that occurs as a result of UVB exposure that can cause various damage to the skin such as redness, hardening, melanin accumulation, skin aging, and even cancer. TGF- β can inhibit melanin accumulation by downregulating MITF. This study aims to determine the effect of exosome mesenchymal stem cell hypoxia (EH-MSC) and glutathione with vitamin C on the expression of TGF- β and MITF genes in C57BL/6 mice with a hyperpigmentation model.

Methods: This study is an in vivo experiment with a post-test only control group design, using 30 male C57BL/6 mice divided into 5 groups: healthy mice (K1), mice with UVB exposure (K2), glutathione and vitamin C injection (K3), exosome injection (K4), and a combination injection of exosome, glutathione, and vitamin C (K5). TGF- β and MITF gene expression were analyzed using RT-qPCR.

Results: TGF- β gene expression analysis showed significant differences between all groups with the Kruskal Wallis test $p = 0.011$ ($p < 0.05$), the lowest average expression was in the K5 group 1.00 ± 0.20 and the highest in the K2 group 2.72 ± 0.64 , while the highest average MITF expression was in the K4 group 1.28 ± 0.97 , and the lowest in the K3 group 0.36 ± 0.17 , there were significant differences between all research groups with the One Way Anova test obtained a p value of 0.035 ($p < 0.05$).

Conclusion: Administration of EH-MSC and glutathione injections with vitamin C affected the expression of TGF- β and MITF genes in C57BL/6 mice with a hyperpigmentation model.

Keywords: Hyperpigmentation, EH-MSC injection, TGF- β expression, MITF.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperpigmentasi merupakan kondisi kulit yang terjadi sebagai akibat dari paparan sinar *ultraviolet B* (UVB), yang dapat menyebabkan berbagai kerusakan pada kulit seperti kemerahan, pengerasan, penumpukan melanin, penuaan kulit, dan bahkan kanker.¹ *Transforming growth factor* (TGF- β) dapat menghambat akumulasi melanin dan aktivitas tirosinase melalui penurunan regulasi jalur kinase yang diatur sinyal ekstraseluler (ERK)/*Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF).² TGF- β dapat menjadi agen pertahanan komprehensif terhadap gangguan hiperpigmentasi.³ Pengobatan hiperpigmentasi menggunakan hidrokuinon sudah menjadi baku emas lebih dari 50 tahun, namun saat ini sangat dibatasi karena tidak sepenuhnya memberantas lesi kulit karena memiliki efek dermatitis alergi atau iritan dan okronosis.⁴ Dengan demikian, ada kebutuhan yang meningkat untuk mengembangkan pilihan pengobatan alternatif yang lebih spesifik dan efektif.⁵ Diketahui pemberian *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSC) secara subcutan dengan dosis 300uL berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan GPx pada kulit yang terpapar sinar UVB.⁶ Kombinasi injeksi glutathione dan vitatamin c juga diketahui secara signifikan mengurangi insiden dan keparahan *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy* (CIPN), berefek meningkatkan kepadatan kolagen pada luka insisi.⁸ Masih minimnya penelitian yang melaporkan injeksi exosome yang dikombinasi dengan glutation dan vitamin c terhadap hiperpigmentasi, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Perawatan hiperpigmentasi menggunakan exosome menjadi pengobatan yang populer pada saat ini.⁹ Alternatif aplikasi lainnya menggunakan glutathione dengan vitamin C dalam perawatan hiperpigmentasi dapat mengurangi produksi melanin dan melindungi kulit dari kerusakan oksidatif.^{10,11} Exosome yang berasal dari sel punca mesenkimal (MSCs) menjadi fokus utama, karena exosome ini telah terbukti memiliki sifat regeneratif dan imunomodulator yang kuat.¹² Exosome dapat memengaruhi sifat-sifat seluler dari sel targetnya dengan mentransfer materi genetik seperti RNA dan DNA, serta protein dan lipid spesifik.¹³ Di samping itu, exosome juga dapat berfungsi sebagai perantara komunikasi antar sel, mengirimkan sinyal-sinyal penting yang mengatur proliferasi, diferensiasi, dan fungsi seluler lainnya⁶. Exosome adalah nanovesikel ekstraseluler yang dihasilkan oleh berbagai jenis sel dan merupakan komponen penting dari komunikasi seluler. Exosome memiliki ukuran sekitar 30-150 nanometer dan mengandung berbagai macam materi genetik, protein, lipid, dan faktor bioaktif lainnya.¹⁴ Exosome yang dihasilkan oleh MSCs dapat berperan dalam berbagai proses biologis, termasuk pemulihan jaringan, modulasi respons imun, dan regulasi sinyal seluler.¹³

Studi pada tahun 2015 menunjukkan bahwa sekitar 4.2% dari 142 subjek yang terpapar tiga kali *minimal erythema dose* (MED) UVB mengalami hiperpigmentasi.¹⁵ Paparan UVB juga telah terkait dengan 8% kasus kanker kulit, termasuk *karsinoma skuamosa* yang memiliki potensi metastasis tinggi.¹⁶ Pada tahun 2020, kasus hiperpigmentasi terus meningkat, dengan lebih dari 100.350 kasus baru dan 6.850 kasus kematian karena perkembangan menjadi kanker kulit. ROS yang berlebihan memicu perjalanan sinyal dan aktivasi faktor transkripsi

nuclear factor-kappa B (NF- κ B), yang berperan dalam mengatur respons inflamasi, meningkatkan ekspresi sitokin inflamasi seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *interleukin-1 α* (IL-1 α), IL-6, dan *interleukin-8* (IL-8) pada kultur sel primer. Peningkatan ini tidak hanya mempengaruhi produksi melanin, tetapi juga menghambat sintesis kolagen dan menyebabkan proses inflamasi yang memainkan peran kunci dalam terjadinya hiperpigmentasi.¹⁵

Jalur sinyal TGF- β dan MITF telah terbukti terlibat dalam regulasi berbagai aspek dari proses melanogenesis, yang merupakan pembentukan melanin dalam melanosit.¹⁷ TGF- β , misalnya, dapat mempengaruhi ekspresi MITF, yang pada gilirannya mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam produksi melanin, seperti *tyrosinase*.^{17,18} MITF juga memainkan peran penting dalam mengontrol proliferasi dan diferensiasi melanosit. Exosome dapat berperan sebagai mediator dalam mengatur jalur sinyal TGF- β dan MITF.¹⁹ Exosome dapat mengirimkan molekul sinyal seperti RNA, protein, dan faktor pertumbuhan yang dapat memengaruhi ekspresi gen TGF- β dan MITF dalam melanosit.¹⁹ Selain itu, exosome juga dapat mengatur aktivitas jalur sinyal TGF- β dan MITF melalui interaksi dengan reseptor spesifik atau molekul sinyal lainnya di permukaan sel target.²⁰

Adanya potensi EH-MSCs sebagai agen alternatif untuk mencegah hiperpigmentasi pada kulit akibat paparan sinar UVB. Maka, dalam penelitian ini akan diinvestigasi pengaruh EH-MSCs pada konsentrasi 42 μ l terhadap ekspresi TGF- β dan MITF pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi iradiasi UVB secara *in vivo*.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen TGF- β dan MITF terhadap mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen TGF- β dan MITF mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.3.2. Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dosis 42 μ l, glutathione dosis 6,24 μ l dan vitamin C dosis 1,26 μ l terhadap ekspresi gen TGF- β antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dosis 42 μ l, glutathione dosis 6,24 μ l dan vitamin C dosis 1,26 μ l ekspresi gen MITF antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSc) glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen MITF mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.4.2. Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSc), glutathione dan vitamin C terhadap ekspresi gen MITF mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
Wang XY, Guan XH, Yu ZP, Wu J, Huang QM, Deng KY, Xin HB, 2021	<i>Human amniotic stem cells-derived exosomal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively</i>	In Vivo Eksperimental	miR-181a-5p dan miR-199a yang berasal dari eksosom hASCs menghambat melanogenesis dengan menekan MITF
Jung Min Lee, Jung Ok Lee, Yujin Kim, You Na Jang, A. Yeon	<i>Anti-melanogenic effect of exosomes derived from human dermal fibroblasts (BJ-5ta-Ex) in C57BL/6 mice and</i>	In Vitro Eksperimental	Pengobatan dengan BJ-5ta-Ex meningkatkan kecerahan jaringan dan mengurangi distribusi melanosom.

Park, Su-Young Kim, Hye Sung Han, 2023	<i>B16F10 melanoma cells</i>		
Lu W, Zhang J, Wu Y, Sun W, Jiang Z, Luo X., 2023	<i>Engineered NF-κB siRNA-encapsulating exosomes as a modality for therapy of skin lesions.</i>	In Vitro Eksperimen	Ketika tikus dengan lesi kulit diolesi dengan si-ADMSC-EXOs, perbaikan kulit yang terkena lesi menjadi lebih cepat dan ekspresi sitokin inflamasi menurun.
Liquan Wang a, Tianhao Li a, Xuda Ma a, Yunzhu Li a, Zhujun Li a, Ziming Li a, 2023	<i>Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate localized scleroderma fibrosis by the let-7a-5p/TGF-βR1/Smad axis</i>	In Vivo dan In Vitro Eksperimen	ADSC-Exo yang terverifikasi membatasi proliferasi dan migrasi LSF
Cita Rosita Sigit Prakoeswa , Febrina Dewi Pratiwi, Nanny Herwanto, Irmadita Citrashanty, Diah Mira Indramaya , Dwi Murtiastutik, Hari Sukanto, Fedik A Rantam, 2019	<i>The effects of amniotic membrane stem cell-conditioned medium on hiperpigmentasi</i>	Clinical study, Eksperimen	amniotic membrane stem cell-conditioned medium memperbaiki kondisi hiperpigmentasi pada 24 subjek wanita

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) adalah sitokin multifungsi yang memainkan peran penting dalam berbagai proses biologis, termasuk pertumbuhan sel, diferensiasi, respons imun, dan perombakan jaringan. Keterlibatannya dalam pigmentasi kulit dan hiperpigmentasi sangat penting.²¹

Peran TGF- β dalam Hiperpigmentasi

1. Regulasi Aktivitas Melanosit

TGF- β dapat mempengaruhi proses melanogenesis (produksi melanin) pada melanosit. TGF- β diketahui dapat menghambat melanogenesis dengan mengurangi ekspresi enzim-enzim kunci yang terlibat dalam produksi melanin, seperti tirosinase. TGF- β dapat menekan proliferasi melanosit, yang mungkin membantu mengendalikan pigmentasi berlebihan dalam kondisi tertentu.

2. Interaksi dengan Faktor-Faktor Lain

TGF- β mempengaruhi interaksi antara melanosit dan keratinosit (tipe sel utama di epidermis). Keratinosit dapat mengeluarkan berbagai faktor yang mempengaruhi perilaku melanosit, dan TGF- β dapat memodulasi interaksi ini. TGF- β berperan dalam respons inflamasi, yang erat kaitannya dengan hiperpigmentasi. Mediator inflamasi dapat

merangsang melanogenesis, dan TGF- β , dengan memodulasi inflamasi, secara tidak langsung mempengaruhi pigmentasi.

3. Penyembuhan Luka dan Pembentukan Jaringan Parut

Selama proses penyembuhan luka, TGF- β terlibat dalam perombakan jaringan dan fibrosis. Hiperpigmentasi pasca-inflamasi (PIH) sering terjadi dalam konteks penyembuhan luka, dan peran TGF- β dalam proses ini dapat mempengaruhi tingkat hiperpigmentasi yang terjadi setelah cedera atau inflamasi kulit.

TGF- β merupakan regulator penting dari pigmentasi kulit, yang mempengaruhi fungsi melanosit, respons inflamasi, dan proses penyembuhan luka.²² Perannya dalam hiperpigmentasi menunjukkan potensinya sebagai target untuk intervensi terapeutik dalam gangguan pigmentasi. Memahami mekanisme kompleks bagaimana TGF- β mempengaruhi pigmentasi dapat mengarah pada pengelolaan dan pengobatan yang lebih baik untuk kondisi hiperpigmentasi.²³

Jalur sinyal TGF- β dimulai ketika ligan TGF- β berikatan dengan reseptor tipe II (TGF- β RII) di permukaan sel. Setelah berikatan, TGF- β RII merekrut dan memfosforilasi reseptor tipe I (TGF- β RI). Aktivasi TGF- β RI kemudian memicu fosforilasi protein Smad2 dan Smad3, yang kemudian memungkinkan berikatan dengan Smad4 untuk membentuk kompleks Smad2/3/4.²³ Kompleks Smad ini kemudian berpindah ke inti sel (*nucleus*) untuk mengatur ekspresi gen target. Dalam konteks pigmentasi kulit, kompleks Smad di dalam inti sel mengikat elemen promotor gen dan

mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam melanogenesis, seperti tirosinase. Dengan mengurangi ekspresi enzim tirosinase, TGF- β menghambat produksi melanin dalam melanosit.²⁴ Selain itu, TGF- β juga dapat menekan proliferasi melanosit, mengurangi jumlah sel yang memproduksi melanin. TGF- β juga berinteraksi dengan berbagai sinyal seluler lain yang mempengaruhi pigmentasi, termasuk sinyal dari keratinosit dan sel inflamasi. Sinyal inflamasi dapat merangsang melanogenesis, namun TGF- β dapat memodulasi respons ini dan mengurangi efeknya, sehingga memainkan peran penting dalam pengaturan pigmentasi dan proses hiperpigmentasi.²⁵

2.2. *Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF)*

MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) memainkan peran penting dalam regulasi produksi melanin, yang terkait dengan hiperpigmentasi. MITF terlibat dalam mengontrol ekspresi gen yang terlibat dalam sintesis melanin, termasuk enzim-enzim kunci seperti *tyrosinase*.²⁶ MITF berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengikat ke daerah pengaturan pada DNA untuk mengaktifkan atau menekan ekspresi gen tertentu. Dalam konteks hiperpigmentasi, MITF dapat mempengaruhi jumlah dan aktivitas melanosit, sel yang menghasilkan melanin, serta produksi melanin itu sendiri.²⁷

Studi menunjukkan bahwa MITF memiliki peran dalam regulasi produksi melanin yang berlebihan yang terjadi dalam beberapa kondisi hiperpigmentasi seperti melasma dan lentigo.²⁷ Faktor-faktor eksternal seperti paparan sinar matahari berlebihan atau perubahan hormon dapat

mempengaruhi ekspresi dan aktivitas MITF, yang pada gilirannya mempengaruhi produksi melanin. Selain itu, mutasi atau variasi genetik pada gen MITF dapat menyebabkan gangguan dalam regulasi melanogenesis (proses pembentukan melanin) dan berkontribusi pada hiperpigmentasi yang terkait dengan kondisi seperti sindrom piebaldisme atau sindrom Waardenburg.²⁸

Peran MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) dalam hiperpigmentasi melibatkan pengaturan produksi melanin yang berlebihan oleh melanosit, sel-sel yang menghasilkan pigmen melanin.²⁹ MITF merupakan regulator utama dalam jalur biokimia yang terlibat dalam melanogenesis, yaitu proses produksi melanin. MITF mengontrol ekspresi gen-gen yang terlibat dalam sintesis melanin, termasuk gen-gen seperti TYR (*tyrosinase*), TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*), dan DCT (*dopachrome tautomerase*). Gen-gen ini berperan dalam konversi asam amino tirosin menjadi melanin. Dengan mengatur ekspresi gen-gen ini, MITF mempengaruhi jumlah dan aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam produksi melanin.³⁰

Dalam kondisi hiperpigmentasi, aktivitas MITF dapat meningkat, mengarah pada peningkatan produksi melanin. Faktor-faktor seperti paparan sinar matahari berlebihan, perubahan hormonal, atau peradangan dapat mempengaruhi aktivitas MITF.³¹ Misalnya, dalam melasma, peningkatan aktivitas MITF dapat disebabkan oleh perubahan hormon seperti kehamilan

atau kontrasepsi hormonal.³² Secara molekuler, MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) berperan dalam regulasi produksi melanin yang berlebihan terkait dengan hiperpigmentasi melalui interaksi dengan jalur-jalur sinyal dan komponen seluler yang terlibat dalam melanogenesis. Berikut adalah beberapa aspek molekuler MITF dalam regulasi produksi melanin yang berlebihan:³³

1. Aktivasi gen-gen melanogenesis: MITF berikatan ke daerah pengaturan pada DNA untuk mengaktifkan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam produksi melanin, seperti TYR (*tyrosinase*), TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*), dan DCT (*dopachrome tautomerase*). Ini melibatkan interaksi protein-protein dan pengenalan dengan motif pengikatan DNA khusus.
2. Transkripsi melalui kompleks transkripsi: MITF bekerja sebagai faktor transkripsi yang terlibat dalam kompleks transkripsi, yang melibatkan interaksi dengan komponen seperti koaktivator, korepresor, dan faktor-faktor transkripsi lainnya. Ini memodulasi proses transkripsi dan mempengaruhi tingkat ekspresi gen-gen melanogenesis.
3. Interaksi dengan faktor-faktor transkripsi lainnya: MITF berinteraksi dengan faktor-faktor transkripsi lainnya, seperti SOX10 dan PAX3, yang juga terlibat dalam regulasi produksi melanin. Interaksi ini dapat memperkuat pengaruh MITF dalam mengatur ekspresi gen-gen melanogenesis dan melibatkan proses molekuler seperti pembentukan kompleks protein-protein.

4. Pengaruh pos-translasi: MITF mengalami modifikasi pos-translasi, termasuk fosforilasi dan glikosilasi, yang dapat mempengaruhi stabilitas, aktivitas, dan translokasi MITF. Modifikasi pos-translasi ini dapat memodulasi regulasi MITF dalam produksi melanin yang berlebihan.
5. Regulasi melalui sinyal jalur terkait: MITF juga dapat terpengaruh oleh berbagai jalur sinyal terkait, seperti jalur Wnt/ β -katenin, jalur MAPK, dan jalur β -adrenergik. Sinyal-sinyal ini dapat memengaruhi aktivitas dan ekspresi MITF, serta memodulasi produksi melanin yang berlebihan.

Dengan interaksi kompleks dan regulasi melalui jalur sinyal serta modifikasi pos-translasi, MITF secara molekuler berperan dalam mengatur produksi melanin yang berlebihan pada hiperpigmentasi. Memahami aspek molekuler MITF dalam regulasi ini dapat membantu dalam pengembangan pendekatan terapeutik yang ditargetkan untuk mengendalikan produksi melanin berlebihan dan mengurangi hiperpigmentasi.^{34,35}

2.3. Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi merupakan kondisi yang ditandai oleh peningkatan produksi melanin, pigmen yang memberikan warna pada kulit, rambut, dan mata. Hal ini menyebabkan timbulnya area kulit yang lebih gelap dari warna kulit normal. Hiperpigmentasi dapat terjadi akibat berbagai faktor, termasuk paparan sinar matahari, perubahan hormon, peradangan, dan kondisi genetik. Salah satu bentuk hiperpigmentasi yang umum adalah melasma, yang ditandai oleh munculnya bercak gelap pada wajah, terutama di daerah pipi, dahi, dan dagu. Melasma sering kali terkait dengan perubahan hormonal,

seperti kehamilan atau kontrasepsi hormonal, serta paparan sinar matahari berlebihan.³⁶

Selain melasma, ada juga kondisi hiperpigmentasi lainnya, seperti lentigo, efelides (bintik-bintik tahi lalat), postinflamasi hiperpigmentasi (PIH) akibat peradangan atau luka, serta beberapa kondisi genetik seperti sindrom piebaldisme atau sindrom Waardenburg. Dalam hiperpigmentasi, peran utama dalam produksi melanin berlebihan dijalankan oleh MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*).³⁷ MITF adalah faktor transkripsi yang mengontrol ekspresi gen-gen yang terlibat dalam melanogenesis, termasuk gen-gen yang mengodekan enzim-enzim seperti *tyrosinase*, *tyrosinase-related protein 1* (TYRP1), dan *dopachrome tautomerase* (DCT). Paparan sinar matahari dan faktor-faktor lain dapat mempengaruhi aktivitas MITF, yang pada gilirannya meningkatkan produksi melanin. Aktivasi MITF melibatkan berbagai jalur sinyal intraseluler, seperti jalur JNK/AP-1, jalur p38 MAPK, jalur cAMP/PKA, dan jalur Wnt/ β -catenin.³⁸

Dalam penelitian terkait hiperpigmentasi, penting untuk memahami mekanisme molekuler yang terlibat dalam regulasi produksi melanin oleh MITF serta jalur-jalur sinyal yang berperan. Pemahaman ini dapat membantu dalam pengembangan pendekatan terapeutik yang ditargetkan untuk mengendalikan produksi melanin berlebihan atau mengurangi hiperpigmentasi secara efektif.³⁹

2.4. *Mesenchymal stem cells (MSCs)*

Mesenchymal stem cells (MSCs) dikenal dengan kemampuan untuk memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel jaringan, termasuk osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit. MSC dapat diperoleh dari berbagai sumber jaringan seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat. Ciri khas MSC termasuk ekspresi penanda permukaan CD seperti CD44+, CD73+, CD90+, dan CD105+, serta tidak memiliki penanda hematopoietik seperti CD34, CD45, CD14, dan HLA-DR. MSC juga memiliki kemampuan imunomodulasi, reparatif, dan regeneratif melalui sinyal parakrin, yang memberikan potensi besar dalam terapi.⁴⁰⁻⁴²



Gambar 2.1. Kemampuan Diferensiasi dari MSC.⁴⁰⁻⁴²

2.4.1. Fungsi

Mesenchymal stem cells (MSC) berperan penting dalam regenerasi jaringan karena kemampuannya untuk berkembang biak dan berdiferensiasi serta memproduksi berbagai faktor seperti faktor pertumbuhan dan sitokin. Stem cell dapat berkomunikasi melalui mekanisme parakrin dan autokrin dengan memanfaatkan sitokin yang dihasilkan.⁴³ Melalui komunikasi parakrin, MSC menstimulasi aktivasi sel lain dalam proses penyembuhan. Selain itu, stem cell memiliki kemampuan homing, yaitu kemampuan untuk mencapai organ target sebagai langkah awal dalam proses penyembuhan sebelum menempel, berkembang biak, dan berdiferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan. Kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel membuat MSC sangat menarik untuk aplikasi klinis. Berbagai penelitian melaporkan keterlibatan MSC dalam restorasi dan regenerasi berbagai kerusakan jaringan, termasuk:^{44,45}

1. Penyakit neurodegeneratif seperti stroke, Parkinson, Alzheimer, dan Huntington.
2. Lesi kardiovaskular seperti infark miokard dan iskemia vaskular perifer.
3. Disfungsi hormonal seperti diabetes mellitus.
4. Gangguan sistem imunitas seperti penyakit autoimun.
5. Kondisi muskuloskeletal seperti fraktur, osteoporosis, dan osteoarthritis.

6. Luka kulit kronis dan ulkus kornea.

2.4.2. Mobilisasi Msc

Telah terbukti bahwa *Mesenchymal Stem Cells* (MSC), ketika ditransplantasikan secara sistemik, memiliki kemampuan untuk bermigrasi ke lokasi kerusakan jaringan pada hewan uji. Ini menunjukkan bahwa MSC memiliki kapasitas migrasi.⁴⁶ Mekanisme migrasi MSC masih belum sepenuhnya dipahami. Reseptor kemokin dan ligannya, serta molekul adhesi, memainkan peran penting dalam proses homing pada jaringan tertentu melalui leukosit.¹³ Banyak penelitian telah menunjukkan ekspresi fungsional berbagai reseptor kemokin dan molekul adhesi pada MSC manusia. Memanfaatkan potensi migrasi MSC melalui modulasi interaksi reseptor kemokin adalah cara yang efektif untuk meningkatkan kemampuan MSC dalam memperbaiki kelainan bawaan jaringan mesenchymal atau memfasilitasi perbaikan jaringan *in vivo*.⁴⁷

Mediator sinyal yang dilepaskan oleh jaringan yang rusak akan memobilisasi MSC untuk menuju ke lokasi kerusakan tersebut. Berbagai jenis mediator sinyal termasuk VEGF (*vascular endothelial growth factor*), *granulocyte colony stimulating factor* (GCSF), kemokin, 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 berbagai interleukin (IL-8, IL-6, IL-3, IL-2, dan IL-1 β).⁴⁸⁻⁵⁰

2.4.3. Konsep Small Molecule Growth Factor MSC

Terminologi fungsional MSC didasarkan pada kemampuannya dalam sekresi berbagai molekul larut secara parakrin. Konsep parakrin ini mengacu pada komunikasi MSC dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal spesifik yang dilepaskan oleh MSC. Secara spesifik, konsep faktor pertumbuhan molekul kecil MSC didasarkan pada:⁵¹⁻⁵³

1. Kompleksitas teknik isolasi MSC: Teknik dan metode yang digunakan untuk mengisolasi MSC memerlukan prosedur yang kompleks, termasuk kerja aseptis dan waktu kultur selama beberapa minggu untuk mendapatkan turunan MSC yang homogen dengan potensi stemness yang tinggi, terutama kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai sel jaringan spesifik. Berbagai faktor harus dikontrol untuk mencapai hasil optimal karena banyak faktor yang mempengaruhi hasil akhir isolasi.
2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat: Penelitian menunjukkan bahwa waktu paruh kehidupan MSC setelah integrasi dalam jaringan cedera pasca transplantasi adalah singkat, sehingga kemungkinan MSC melakukan fungsi regenerasi secara optimal menjadi berkurang. Faktor-faktor

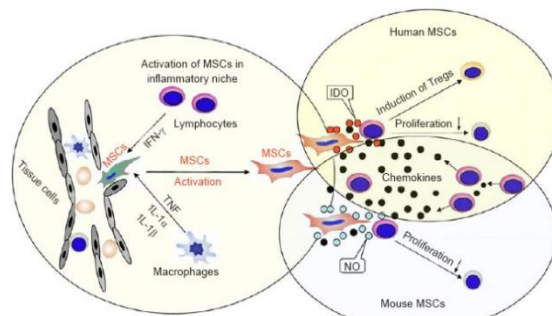
internal dalam jaringan cedera juga mempengaruhi waktu paruh kehidupan MSC.

3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi: Penelitian terkini mengungkapkan bahwa sebagian besar MSC yang diberikan secara intravena akan terjebak di paru sebagai emboli kecil (tanpa menyebabkan oklusi vaskuler). Meskipun demikian, MSC yang terjebak ini tetap melepaskan berbagai molekul antiinflamasi dan pro-regenerasi. Hal ini menunjukkan bahwa molekul kecil dan eksosom yang dilepaskan oleh MSC secara parakrin merupakan faktor utama dalam regenerasi jaringan.

2.4.4. Induksi Small Molecule dan Exosome MSC

Pentingnya peran molekul kecil dan exosome MSC telah mendorong berbagai upaya untuk memproduksi molekul kecil dan exosome ini secara *in vitro*. Induksi molekul kecil faktor pertumbuhan MSC dapat dibagi menjadi dua metode: ^{49,51-53}

1. Induksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi: Secara teoritis, MSC yang diaktifkan oleh $\text{TNF-}\alpha$ dapat melepaskan berbagai molekul anti-inflamasi.



Gambar 2.2. Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC. ^{49,51-53}

2. Induksi MSC dengan teknik hipoksia: MSC yang diinkubasi dalam kondisi hipoksia akan melepaskan berbagai molekul pro-regenerasi. Teori ini dikenal sebagai *hypoxic preactivated MSC-induced soluble molecule*, yaitu molekul-molekul terlarut yang dilepaskan MSC dalam kondisi hipoksia. Kondisi hipoksia pada MSC diketahui dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 sebagai molekul kecil dan ekspresi berbagai antioksidan seperti GPX, *superoksida dismutase* (SOD)1, SOD2, *katalase* (CAT), dan *sirtuin* (SIRT)1 dan 3 yang terakumulasi dalam eksosom. Produksi IL-10 oleh MSC dapat menghambat faktor transkripsi nuclear factor kappa B yang memicu overekspresi ROS. Selain itu, antioksidan yang diekspresikan langsung oleh MSC melalui eksosom, seperti GPX, dapat mengaktivasi faktor transkripsi NRF2 yang meningkatkan ekspresi antioksidan. Selain itu, berbagai miRNA dalam eksosom MSC hipoksia, seperti miR-21, miR-22-3p, dan miR-215-5p, juga berperan dalam menghambat stres oksidatif.

2.5. Injeksi Glutathione dengan Vitamin C

Kombinasi glutathione dengan vitamin C dalam perawatan hiperpigmentasi bekerja melalui mekanisme molekuler yang saling melengkapi untuk mengurangi produksi melanin dan melindungi kulit dari kerusakan oksidatif.⁵⁴⁻⁵⁶ Glutathione menghambat aktivitas enzim *tyrosinase*, yang merupakan enzim kunci dalam proses melanogenesis atau produksi

melanin, dengan mengurangi konversi L-tyrosine menjadi DOPA dan DOPAquinone yang akhirnya membentuk eumelanin. Selain itu, glutathione mengarahkan produksi melanin menuju pembentukan pheomelanin yang lebih terang. Sebagai antioksidan yang kuat, glutathione juga menetralkan radikal bebas, mencegah kerusakan oksidatif pada sel-sel kulit yang dipicu oleh paparan sinar UV.⁵⁷

Vitamin C atau asam askorbat juga berperan penting dalam menghambat *tyrosinase*, baik secara langsung maupun dengan mereduksi DOPAquinone kembali menjadi DOPA, sehingga mengurangi jumlah substrat yang tersedia untuk produksi melanin. Sebagai antioksidan, vitamin C menetralkan radikal bebas dan membantu dalam regenerasi glutathione dari bentuk teroksidasi (GSSG) kembali ke bentuk tereduksi (GSH), meningkatkan efektivitas glutathione sebagai antioksidan. Selain itu, vitamin C adalah kofaktor yang penting dalam biosintesis kolagen, yang membantu memperbaiki dan menjaga kekenyalan serta kekencangan kulit, memperbaiki kerusakan akibat radikal bebas, dan mendukung struktur kulit yang sehat.^{57,58}

Ketika digunakan bersama, glutathione dan vitamin C memberikan efek sinergis dalam menghambat aktivitas *tyrosinase* dan mengurangi produksi melanin melalui mekanisme yang sedikit berbeda namun saling melengkapi. Kombinasi ini juga memberikan perlindungan antioksidan ganda terhadap radikal bebas dan kerusakan oksidatif, dengan vitamin C membantu meregenerasi glutathione agar tetap aktif lebih lama dalam melawan radikal bebas⁵⁰⁻⁵¹. Selain itu, vitamin C memperkuat produksi kolagen, membantu

memperbaiki dan mempertahankan struktur kulit yang sehat, sementara glutathione menjaga keseimbangan redoks dalam sel kulit. Dengan pemahaman ini, dapat disimpulkan bahwa kombinasi glutathione dan vitamin C bekerja secara sinergis dan efektif dalam mengatasi hiperpigmentasi, memberikan solusi yang lebih holistik untuk masalah kulit ini.^{59,60}

Peneliti melaporkan pemberian vitamin C subkutan disekitar luka insisi dermal berefek pada pembentukan kolagen yang lebih padat dalam proses penyembuhan luka. Metode eksperimental ini menggunakan tikus Wistar dilakukan insisi di punggung sepanjang 2 cm. Kelompok perlakuan diberi suntikan vitamin C subkutan disekitar luka insisi dermal sebanyak 9 mg (0,09ml), hasil kepadatan kolagen pada hari kelima menunjukkan perbedaan yang bermakna dari efek penyuntikan vitamin C subkutan terhadap kepadatan kolagen. Penyuntikan vitamin C subkutan disekitar luka insisi dermal efektif dalam meeningkatan kepadatan kolagen.⁸

Penelitian lainnya dengan penggunaan glutathione yang dikombinasikan dengan mecobalamin dalam pencegahan dan pengobatan neuropati perifer (PN) pada pasien mieloma multipel (MM). Pasien dalam kelompok studi diberikan 2,4 g glutathione secara intravena sekali sehari 2–3 hari sebelum kemoterapi, dikombinasikan dengan 500 µg mecobalamin yang diberikan secara intravena sekali setiap dua hari hingga akhir siklus kemoterapi. Glutathione yang dikombinasikan dengan mecobalamin secara signifikan mengurangi insiden dan keparahan CIPN pada pasien MM, dan tidak meningkatkan reaksi merugikan pada pasien MM. Diabetes dan

bortezomib intravena meningkatkan insiden dan keparahan PN pada pasien MM.⁷

2.6. Pengaruh Exosome dan Glutathione dengan Vitamin C terhadap ekspresi gen TGF-B dan MITF

Exosome, Glutathione, dan Vitamin C adalah komponen yang secara sinergis dapat memodulasi jalur molekuler (*pathway*) yang terlibat dalam pengaturan hiperpigmentasi kulit, terutama melalui pengaruhnya terhadap ekspresi gen TGF-B (*Transforming Growth Factor-Beta*) dan MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*). Exosome adalah vesikel kecil yang dikeluarkan oleh sel dan mengandung berbagai molekul bioaktif seperti protein, RNA, dan lipida. Dalam konteks pengaturan hiperpigmentasi, exosome memainkan peran penting dalam modifikasi jalur sinyal seluler.⁶¹⁻⁶⁴ Exosome dapat membawa miRNA atau protein yang mempengaruhi jalur TGF-B, yang mengatur proliferasi sel, diferensiasi, dan migrasi. Jalur TGF-B melibatkan aktivasi reseptor TGF-B di permukaan sel yang kemudian mengaktifkan SMAD protein, yang masuk ke dalam inti sel dan memodulasi transkripsi gen target. Dengan memodulasi aktivitas TGF-B melalui komponen exosome, regenerasi sel kulit dapat ditingkatkan dan inflamasi dapat dikurangi, sehingga membantu mengatasi hiperpigmentasi. Selain itu, exosome dapat mempengaruhi ekspresi MITF dengan membawa molekul regulator seperti miRNA yang menargetkan mRNA MITF. MITF adalah faktor transkripsi kunci dalam sintesis melanin, yang mengendalikan ekspresi gen-gen seperti tirosinase, TRP-1, dan TRP-2 yang terlibat dalam produksi melanin. Dengan

mengatur ekspresi MITF, exosome dapat membantu mengurangi produksi melanin dan mengatasi hiperpigmentasi.⁶⁵

Glutathione adalah antioksidan kuat yang berperan dalam detoksifikasi dan pertahanan terhadap stres oksidatif. Glutathione dapat mempengaruhi jalur TGF-B dengan mengurangi stres oksidatif yang berlebihan dan menstabilkan lingkungan seluler. Dengan mengurangi stres oksidatif, glutathione dapat menormalkan ekspresi TGF-B, yang pada gilirannya mengatur proses perbaikan jaringan dan mengurangi respon inflamasi yang berlebihan. Selain itu, glutathione dapat mengurangi aktivitas MITF melalui jalur redoks, sehingga menghambat produksi melanin dan mengatasi hiperpigmentasi.^{66,67} Glutathione juga mempengaruhi produksi melanin dengan menghambat oksidasi tirosin menjadi melanin melalui regulasi redoks. Selain itu, glutathione dapat mempengaruhi jalur ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) dan p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), yang berperan dalam regulasi MITF. Penghambatan jalur ERK dan p38 MAPK oleh glutathione dapat menurunkan aktivitas MITF dan produksi melanin.^{67,68}

Vitamin C (asam askorbat) adalah antioksidan yang kuat dan esensial untuk berbagai fungsi biologis. Vitamin C dapat merangsang produksi kolagen dan regenerasi kulit melalui aktivasi jalur TGF-B. Aktivasi TGF-B oleh Vitamin C mengarah pada aktivasi SMAD protein yang meningkatkan transkripsi gen yang terlibat dalam produksi kolagen dan perbaikan jaringan, membantu mengurangi hiperpigmentasi dan meningkatkan penyembuhan kulit. Vitamin C juga mengurangi produksi melanin dengan menghambat aktivitas

tirosinase, enzim yang mengkatalisis tahap awal sintesis melanin. Vitamin C juga dapat mengurangi ekspresi MITF melalui jalur redoks dan modulasi jalur ERK dan p38 MAPK. Dengan menghambat jalur ini, Vitamin C menurunkan aktivitas MITF dan mengurangi produksi melanin, membantu mencerahkan kulit dan mengurangi bintik-bintik gelap.^{68,69}

Kombinasi ketiga komponen ini menawarkan pendekatan multifaset dalam mengatasi hiperpigmentasi. Pengurangan stres oksidatif dan inflamasi oleh exosome, glutathione, dan vitamin C membantu mengurangi peradangan dan stres oksidatif, faktor utama yang memicu hiperpigmentasi. Modulasi jalur TGF-B oleh exosome dan vitamin C meningkatkan regenerasi sel kulit dan produksi kolagen, serta mengurangi inflamasi, sementara glutathione membantu menstabilkan ekspresi TGF-B dengan mengurangi stres oksidatif. Regulasi ekspresi MITF oleh exosome, glutathione, dan vitamin C menghambat jalur ERK dan p38 MAPK, menurunkan aktivitas MITF dan produksi melanin. Vitamin C juga menghambat tirosinase, mengurangi sintesis melanin. Dengan demikian, penggunaan exosome, glutathione, dan vitamin C bersama-sama dapat memberikan efek sinergis dalam mengatasi hiperpigmentasi melalui berbagai jalur molekuler, meningkatkan regenerasi kulit, mengurangi stres oksidatif dan inflamasi, serta menghambat produksi melanin.^{70,71}

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

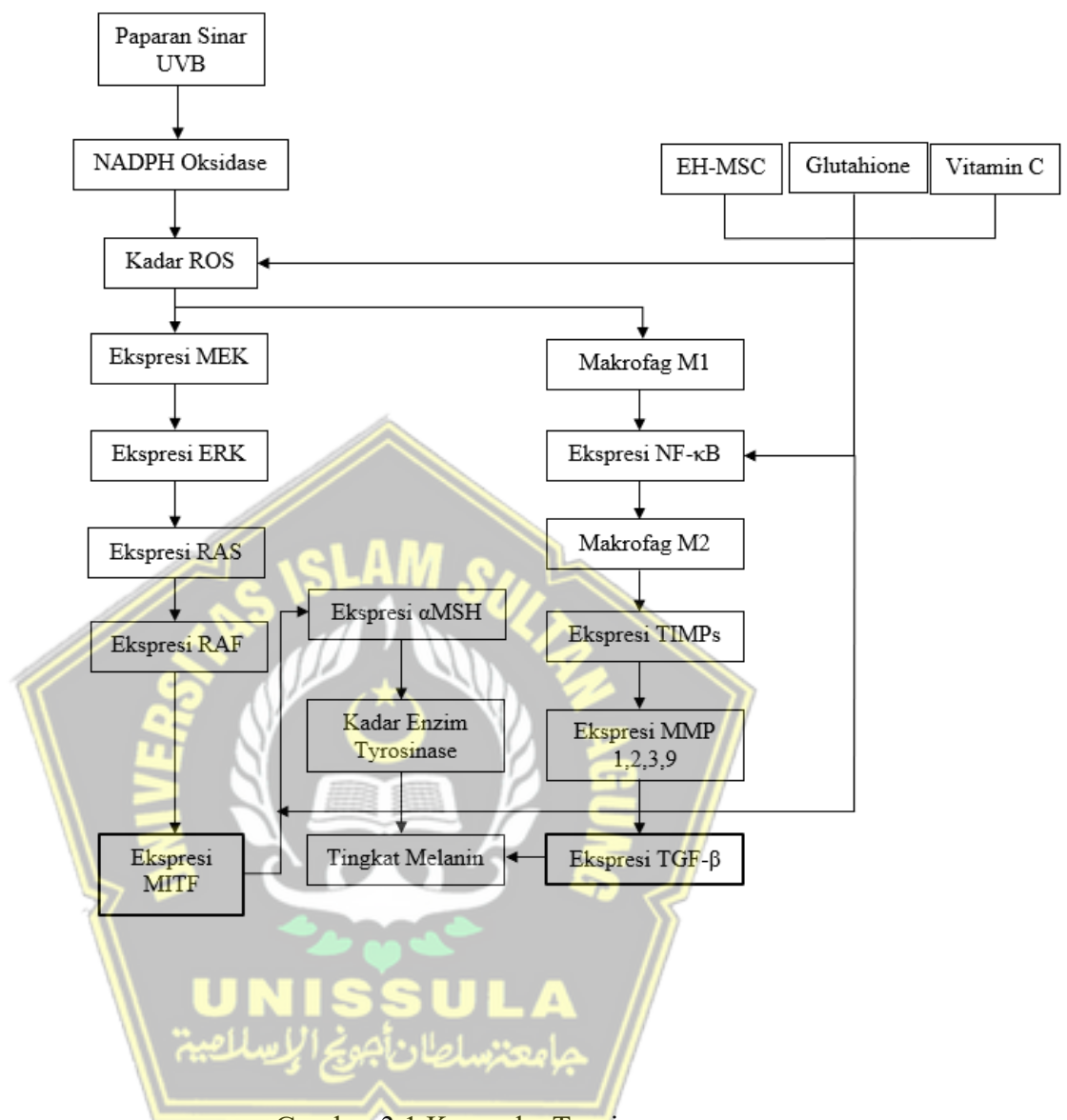
Hiperpigmentasi terjadi akibat kulit terpapar sinar UV-B berlebih menyebabkan meningkatnya jumlah melanin.⁷² Inflamasi yang dimediasi melalui ROS yang memengaruhi melanosit di epidermis.⁷³ Melanogenesis melalui p53 memicu peningkatan ekspresi POMC untuk mensekresikan α -MSH yang mengatur ekspresi MITF, selanjutnya memicu enzim tyrosinase, Tyrp1 dan Tyrp2. Selain itu, radiasi UV-B ROS meningkatkan ROS dalam sel keratin dan melanosit, dan menyebabkan kerusakan DNA.⁵ TGF- β menurunkan sintesis melanin melalui penurunan regulasi ekspresi mRNA MITF melalui aktivasi ERK. Pensinyalan ERK mengurangi sintesis melanin melalui degradasi MITF.² TGF- β memediasi penurunan regulasi aktivitas promotor MITF, mengurangi produksi tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 dan kadar protein MITF. TGF- β menghambat faktor transkripsi dan pengatur utama MITF dalam melanosit, memengaruhi jalur ERK dan menurunkan regulasi MITF serta produksi enzim melanogenik.⁷⁴

TGF- β dan MITF memiliki peran penting dalam regulasi melanogenesis, yang mempengaruhi proses hiperpigmentasi. Jalur sinyal TGF- β dimulai ketika TGF- β berikatan dengan reseptornya, mengaktifkan protein SMAD melalui fosforilasi. Kompleks SMAD yang diaktifkan kemudian masuk ke dalam inti sel dan mengatur ekspresi gen, termasuk gen yang dapat menekan MITF (*Microphthalmia-associated Transcription*

Factor). TGF- β berfungsi sebagai penghambat proliferasi melanosit dan sintesis melanin dengan menurunkan ekspresi MITF, sehingga mengurangi enzim melanogenik seperti *tyrosinase*, TRP-1 dan TRP-2.^{41,42,44,45}

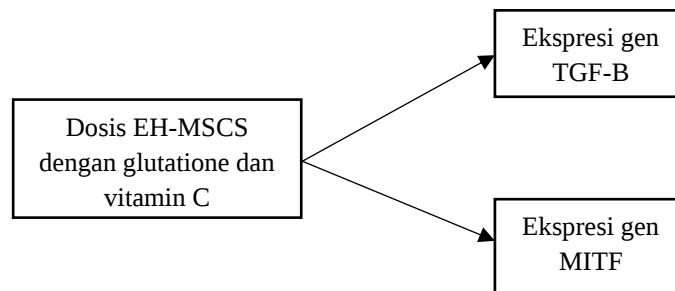
MITF merupakan regulator utama perkembangan dan fungsi melanosit yang diaktifkan oleh beberapa jalur, termasuk jalur Wnt/ β -catenin dan cAMP/PKA. Aktivasi MITF meningkatkan transkripsi enzim melanogenik yang penting untuk produksi melanin. Exosome dari beberapa jenis sel dapat mentransfer miRNA atau protein yang menghambat atau merangsang melanogenesis.^{49,51-53,56} Misalnya, miRNA dalam exosome dapat menargetkan mRNA MITF untuk degradasi, sehingga mengurangi sintesis melanin. Glutathione, sebagai antioksidan kuat, mengurangi stres oksidatif dalam melanosit, mempengaruhi melanogenesis, dan dapat mempengaruhi keseimbangan antara produksi eumelanin dan pheomelanin. Vitamin C bertindak sebagai agen reduktor yang menghambat enzim *tyrosinase*, sehingga mengurangi sintesis melanin. Vitamin C juga berkontribusi pada pertahanan antioksidatif dalam melanosit, yang berpotensi mengurangi hiperpigmentasi.⁵⁹⁻⁶²

Secara keseluruhan, sinyal TGF- β secara negatif mengatur melanogenesis dengan menghambat MITF, sementara MITF yang diaktifkan melalui berbagai jalur mempromosikan produksi melanin. Exosome, glutathione, dan vitamin C memodulasi jalur-jalur ini pada titik-titik yang berbeda, mempengaruhi proses pigmentasi secara keseluruhan dan berpotensi mengurangi hiperpigmentasi.^{65,66}



Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

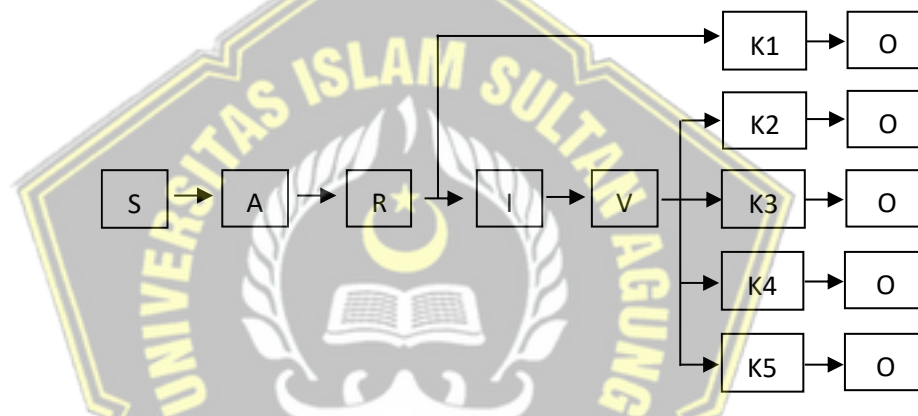
1. Terdapat pengaruh ekspresi gen TGF- β dengan pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) pada dosis 42 μ l dan glutathione dosis 6,24 μ l dengan vitamin C dosis 1,26 μ l antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.
2. Terdapat pengaruh ekspresi gen MITF dengan pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) pada dosis 42 μ l, glutathione dosis 6,24 μ l dan vitamin C dosis 1,26 μ l antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah mencit jantan galur C57BL/6 dengan bobot badan 20-25 gr, perlakuan terdiri dari:



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Sampel

A : Aklimatisasi

R : Randomisasi

I : Induksi UVB

V : Validasi

K1 : Mencit sehat tanpa paparan UVB.

K2 : Kontrol Negatif (Mencit dengan paparan UVB)

K3 : Perlakuan 1 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi

glutathion 6,24µl dan vitamin C 1,26µl)

K4 : Perlakuan 2 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan
Injeksi exosome 42µl).

K5 : Perlakuan 3 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi
glutathion 6,24µl + vitamin C 1,26µl dan perlakuan injeksi exosome
42µl)

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1 Variabel bebas

Injeksi exosome, dan glutathion dengan Vitamin C

4.2.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen TGF-
β dan MITF

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1 Exosome, Glutathion dan Vit C

Kombinasi dosis Exosome, Glutathione, dan Vitamin C diaplikasikan pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi untuk mengevaluasi efek sinergisnya terhadap ekspresi TGF-β dan MITF, yang berperan dalam regulasi pigmentasi kulit. Exosome yang digunakan berasal dari Mesenchymal Stem Cells yang dikondisikan dalam kondisi hypoxia (EH-MSCS) dan mengandung berbagai biomolekul yang berperan dalam modulasi seluler. Glutathione diberikan sebagai antioksidan

tripeptida yang berfungsi menekan stres oksidatif serta menghambat produksi melanin, sedangkan Vitamin C digunakan sebagai agen antioksidan yang tidak hanya mendukung peningkatan kadar glutathione, tetapi juga berperan dalam modulasi ekspresi gen yang terkait dengan pigmentasi. Kombinasi dosis ini dirancang untuk menilai interaksi serta potensi efek terapeutik dalam menekan hiperpigmentasi melalui modulasi ekspresi TGF- β dan MITF pada mencit model hiperpigmentasi.

Skala : Ordinal

Satuan : mg

4.2.2.2 TGF- β

Ekspresi TGF- β pada jaringan kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi, pengukuran ekspresi CD163 pada jaringan kulit setelah terpapar sinar UVB dilakukan pada hari ke 8 dengan ekstraksi RNA untuk dianalisa dengan metode qRT-PCR, di laboratorium SCCR Semarang.

Skala data : rasio

Satuan : m TGF- β RNA *relative expression* (x)

4.2.2.3 MITF

Ekspresi MITF pada jaringan kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi, pengukuran ekspresi MITF pada jaringan kulit setelah terpapar sinar UVB dilakukan pada hari

ke 8 dengan ekstraksi RNA untuk dianalisa dengan metode qRT-PCR, di laboratorium SCCR Semarang.

Skala data : rasio

Satuan : m MITF RNA *relative expression* (x)

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah mencit jantan galur C57BL/6 berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 20-25 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia.

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitain ini adalah mencit C57BL/6 yang diberi paparan UVB 180mJ/cm².

mencit C57BL/6

4.3.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut

1. Mencit jantan galur C57BL/6
2. Umur 2-3 bulan.

3. Mendapatkan paparan UVB
4. Mencit sehat dan aktif selama masa aklimatisasi
5. Berat badan 20-25 gram.

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Mencit jantan galur C57BL/6 dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.2.3 Kriteria Drop Out

Mencit yang masuk kriteria drop out pada penelitian ini adalah mencit mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara Randomized Sampling. Mencit jantan galur C57BL/6J dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok 1 mencit sehat tanpa paparan UVB, Kelompok 2 kontrol negatif mencit dengan paparan UVB), kelompok 3 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µl dan vitamin C 1,26µl, kelompok 4 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan exosome 42µl, kelompok 5 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24µl + vitamin C 1,26µl dan perlakuan exosome 42µl

4.3.4. Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung berdasarkan sampel eksperimental dari Federer. Rumus Federer yaitu: $(t-1)(n-1) \geq 15$, dari rumus tersebut didapat hasil n adalah 6. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan yaitu 4 dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan. Sehingga sampel yang digunakan adalah 6 ekor per kelompok kemudian diambil secara acak. Dibagi menjadi 5 kelompok sehingga jumlahnya adalah 30 ekor mencit ditambah cadangan 5 ekor menjadi total 35 ekor.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain, UV chamber, pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum mencit dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm *biopsy punch*, sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL.

Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain *microplate reader*, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan untuk perlakuan seperti water base gel, ketamin, *xylazine*, etanol, akuades, pakan mencit, dan chloroform.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Permohonan *ethical clearance* penelitian diajukan kepada komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

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

1. *Umbilical cord* yang telah dipisahkan dari pembuluh darah diletakkan ke petri dish dan dicuci sampai bersih menggunakan PBS
2. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 75T secara merata dan diamkan selama 3 menit dalam inkubator hingga *umbilical cord* melekat pada permukaan flask.
3. Medium kultur yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
4. *Umbilical cord* diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.

5. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang sebagian medium dan diganti dengan medium kultur baru.
6. Sel akan muncul setelah kurang lebih 3 hari dari awal proses kultur dan dapat dipanen setelah 14 hari
7. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai kerapatan 80%.

Proses *Hypoxia*

1. MSC yang telah mencapai kerapatan 80% dimasukkan ke dalam *hypoxia chamber*.
2. Gas nitrogen dimasukkan melalui katup inlet hingga indicator kadar O₂ dalam *hypoxia chamber* menunjukkan konsentrasi 5%.
3. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
4. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan exosome.

Pembuatan sediaan injeksi exosome

Pembuatan sediaan injeksi dilakukan dengan cara mengambil cairan exosome sesuai dosis menggunakan spuit 1cc.

4.5.3. Penetapan Dosis

Penelitian sebelumnya menggunakan exosome sebanyak 300ul untuk injeksi subcutan pada tikus yang dikonversi pada mencit (x 0,14) sehingga menjadi 42µl yang diinjeksikan secara subcutan pada kulit yang terpapar UVB. Dosis Glutathione yang digunakan

berdasarkan Hao et al (2021) dimana penggunaan glutathione yang dikombinasikan dengan mekobalamin dalam pencegahan dan pengobatan neuropati perifer (PN) pada pasien mieloma multipel (MM), Pasien dalam kelompok penelitian diberikan 2,4g glutathione secara intravena yang dikonversi ke dosis mencit ($\times 0,0026$), sehingga didapat dosis glutathione adalah 6,24 $\mu\text{l}/20\text{gBB}$ mencit.⁷ Penelitian Darma et al menggunakan tikus Wistar Kelompok perlakuan diberi suntikan vitamin C subkutan disekitar luka insisi dermal sebanyak 9 mg (0,09ml), Vitamin C dengan dosis 9mg pada tikus dikonversi ke mencit (0,14) sehingga didapat dosis vitamin C 1,26 $\mu\text{l}/20\text{gBB}$ mencit.⁸

Rekomendasi maksimum untuk perlakuan subcutan pada mencit adalah 0,25ml, perlakuan dosis kombinasi jika dijumlahkan yaitu glutathione 6,24 μl + vitamin C 1,26 μl dan perlakuan injeksi exosome 42 μl , Total Volume Dosis yaitu 49,5 μl .

4.5.4. Paparan UV-B

1. Mencit di adaptasikan selama 7 hari
2. Setelah itu seluruh mencit di randomisasi dan di bagi menjadi 4 kelompok
3. Mencit di buat sedasi, dilakukan di infeksi terlebih dahulu dengan alkohol swab pada perut kiri bawah mencit, kemudian injeksi 0,5 cc ketamine 90% + xylazine 10% di bagian Intraperitoneal mencit

4. Cukur bagian punggung mencit selebar 2x2cm, tunggu mencit sampai terbebas dari efek sersedasi
5. Mencit dipapar UVB 180mJ/cm² di alam UV chamber selama 10 menit, enam kali dalam dua minggu.
6. Seluruh mencit di masukkan ke kandang sesuai kelompok, di biarkan tanpa perlakuan dan di beri pakan standar selama 24 jam
7. Validasi dilakukan dihari ke-14 untuk dilakukan pewarnaan *Masson Fontana*

4.5.5 Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Jaringan

Mencit setelah 24 jam pemberian perlakuan terakhir dimatikan dengan cara servikal dislokasi untuk proses pengambilan jaringan. Jaringan kulit diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang diinduksi. Sampel jaringan kulit dipreservasi dalam larutan RNA later untuk mempertahankan kualitas RNA. Sampel kulit dalam RNA disimpan dalam suhu -20°C hingga proses analisis PCR dilakukan.

4.5.6 Analisis pewarnaan Masson Fontana untuk Pengecekan Kadar Melanin

Langkah-langkah pengecatan *Masson fontana* merupakan teknik pewarnaan histologi yang digunakan untuk menyoroti melanin pada jaringan. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

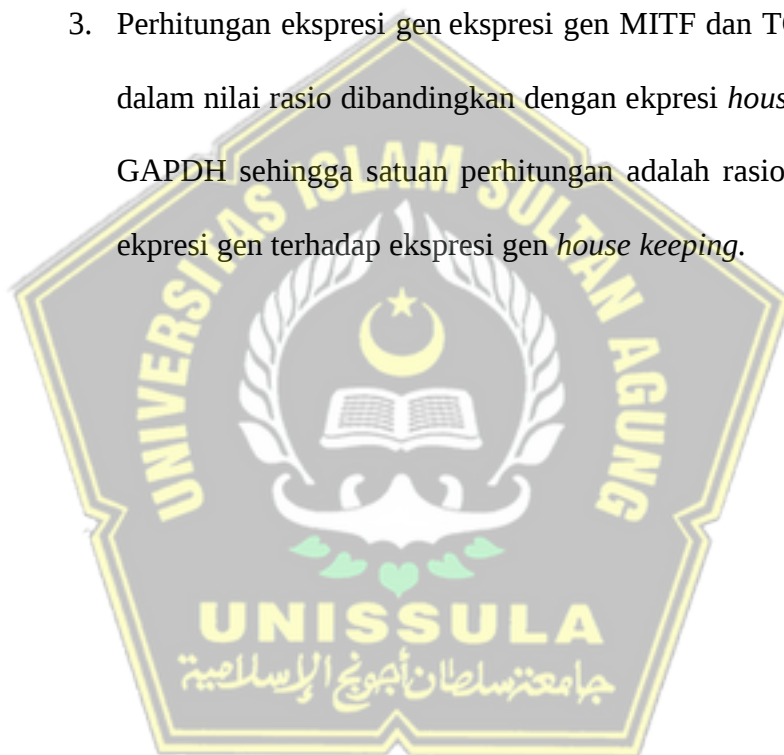
Jaringan kulit di potong secara membujur untuk pengamatan histologis secara lengkap. Pembuatan preparat jaringan dilakukan di

Laboratorium Kesehatan Hewan Jawa Tengah. Pengecatan melanin dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan Masson Fontana dengan tahapan pertama deparafinisasi slide jaringan dengan pemanasan cairan bouin ke 54-64°C. Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide di hematigoksin besi weigert selama 5 menit. Inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit dan inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/ fosfotungstat selama 10-15 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit. Inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit dan diamati di bawah mikroskop. Apabila terdapat peningkatan jumlah melanin secara signifikan dibandingkan kelompok sehat yang ditandai dengan munculnya warna kehitaman pada bagian epidermis.⁷⁵

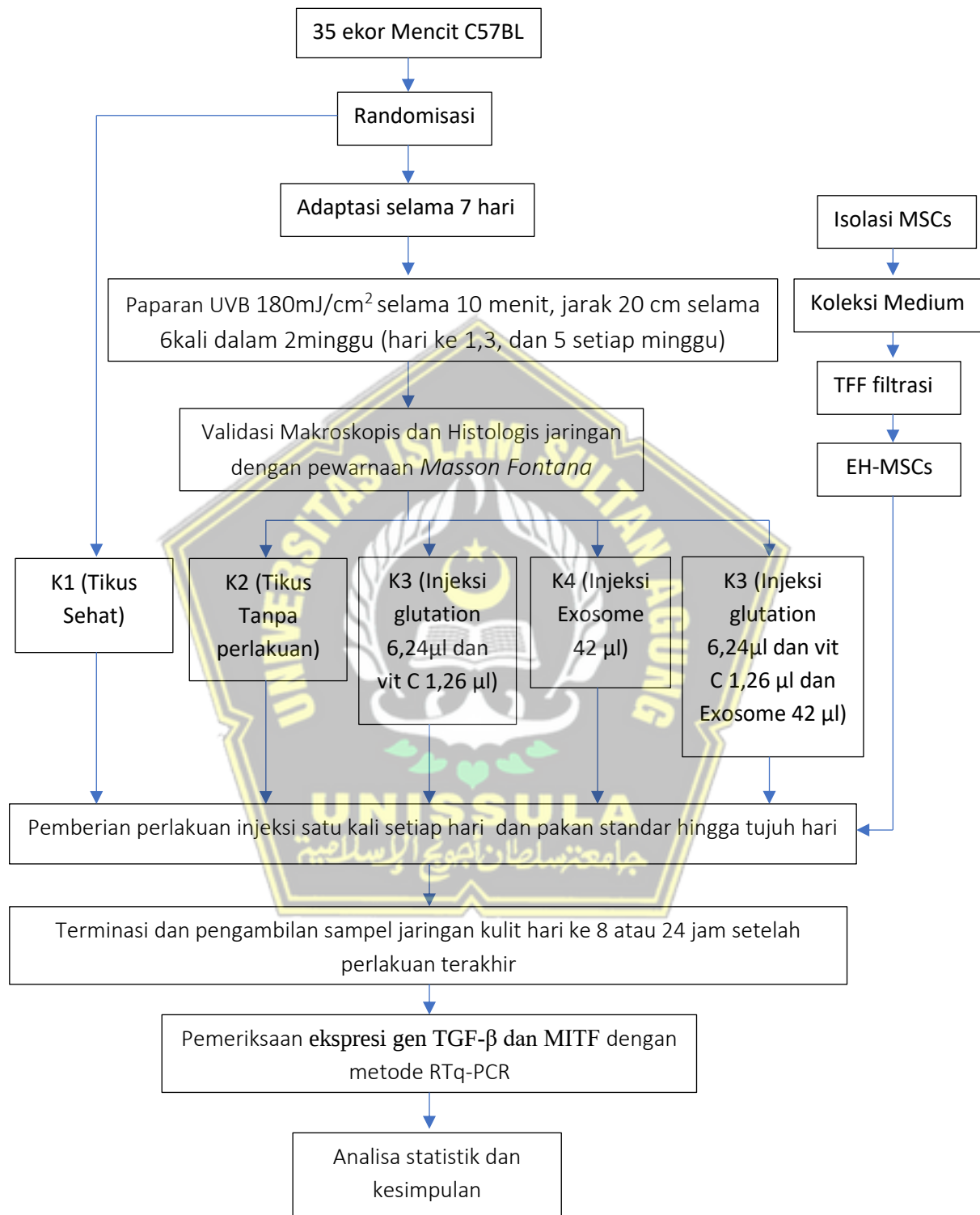
4.7.8 Analisis Ekspresi TGF- β dan MITF Menggunakan Metode RTq-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁷⁶ Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad).

2. Penentuan ekspresi gen MITF dan TGF- β diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti.
3. Perhitungan ekspresi gen ekspresi gen MITF dan TGF- β dihitung dalam nilai rasio dibandingkan dengan ekspresi *house keeping* gen GAPDH sehingga satuan perhitungan adalah rasio mRNA level ekspresi gen terhadap ekspresi gen *house keeping*.



4.6 Alur Penelitian



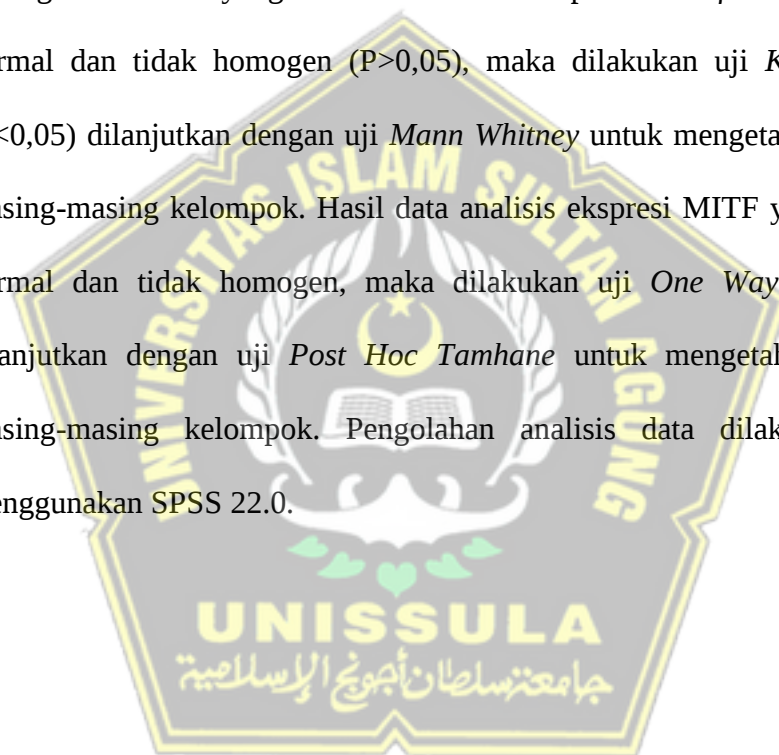
Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.7 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Animal Model Research Center SCCR Indonesia. Penelitian dilakukan pada November-Desember 2024.

4.8 Analisa Data

Data dianalisis menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas. Data yang dihasilkan untuk ekspresi TGF- β didapatkan tidak normal dan tidak homogen ($P > 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Hasil data analisis ekspresi MITF yang diperoleh normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 HASIL PENELITIAN

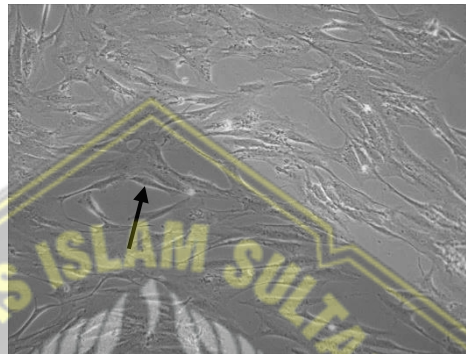
Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen TGF- β dan MITF mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi. Penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan November-Desember 2024 di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Semarang.

Subjek pada penelitian menggunakan mencit galur C57BL/6 berjumlah 30 ekor mencit yang dibagi menjadi 5 kelompok, Kelompok (K1) mencit sehat paparan UVB, kelompok (K2) kontrol negatif mencit dengan paparan UVB tanpa perlakuan, kelompok perlakuan 1 (K3) mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24 μ l dan vitamin C 1,26 μ l, kelompok perlakuan 2 (K4) mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi exosome dosis 42 μ l, dan kelompok perlakuan 3 (K5) mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi glutathion 6,24 μ l + vitamin C 1,26 μ l dan perlakuan injeksi exosome 42 μ l.

5.1.1 Validasi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MSC)

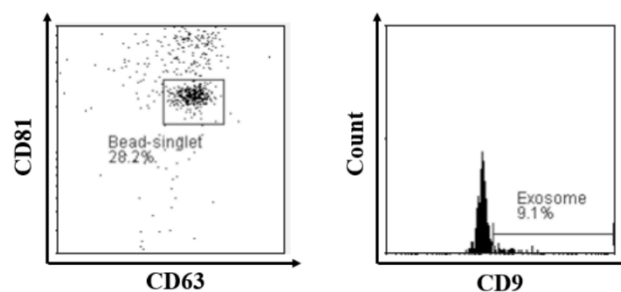
MSC yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari tali pusat mencit bunting yang diisolasi di laboratorium *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia. Selanjutnya, hasil isolasi ini dikultur pada

flask plastik yang telah dilengkapi dengan medium khusus. Setelah mencapai pasase ke-5, hasil kultur MSCs menunjukkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi yang menyerupai sel berbentuk *spindle-like cell* saat diamati di bawah mikroskop, ditunjukkan pada gambar 5.1.



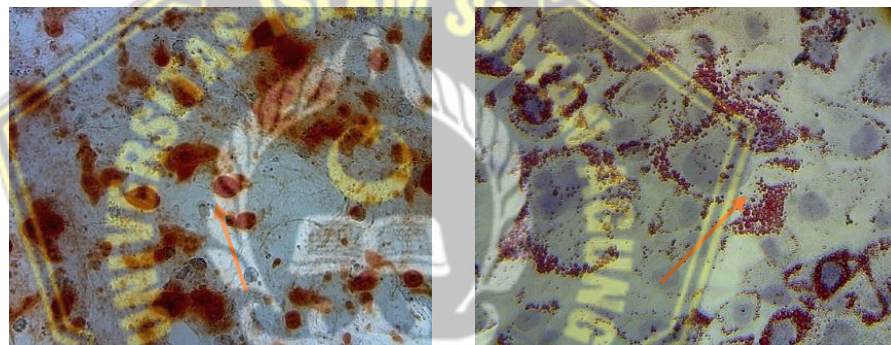
Gambar 5.1 hasil kultur MSCs sel berbentuk *spindle-like* dengan pembesaran 100x.

Validasi MSC diperiksa dengan *flow cytometry* yang bertujuan untuk menguji kemampuan MSC dalam mengungkapkan berbagai penanda khusus permukaan. Temuan dalam analisis menunjukkan MSC mengekspresikan CD90,1 sebanyak 97,6%, CD29 sebanyak 97,7%, sementara CD45 hanya diekspresikan sekitar 1,5%, dan CD31 sekitar 3,2%, seperti pada gambar 5.2.



5.2 Validasi exosome terhadap ekspresi marker CD81, CD63 dan CD9.

Penelitian ini juga memvalidasi kemampuan MSC untuk mengalami diferensiasi menjadi jenis sel dewasa yang berbeda. MSC diberi medium yang dirancang khusus untuk memfasilitasi diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MSC mampu mengalami diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit, yang dapat diidentifikasi melalui endapan kalsium serta pengamatan adanya lemak berwarna merah dalam pewarnaan *Alizarin Red* dan pewarnaan *oil Red dye* pada masing-masing kultur osteogenik dan adipogenik.



Gambar 5.3 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit (kiri) dan (kanan) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red* pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah orange)

Sel MSCs dilakukan inkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi O_2 5% selama 24 jam menggunakan hipoksia chamber. Media kultur MSCs yang mengandung *secretome* kemudiandifiltrasi menggunakan metode TFF (*Tangential Flow Filtration*) berdasarkan *molecular weight cut-off* didapat molekul berukuran 100-500 kDa yang mengandung *exosome*.^{12,77,78} Selanjutnya Exosome Hipoksia MSC divalidasi menggunakan *flowcytometry* untuk memastikan bahwa sel

yang ter-filtrasi mengandung marker exosome, caranya dengan melihat kuantifikasi marker exosome yang terbaca yaitu CD63, CD81, dan CD9. Hasilnya, jumlah exosome yang terbaca dalam analisis *flowcytometry* menggunakan marker CD81, CD63 dan CD9 positif adalah 9.1%.

5.1.2 Validasi jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi

Hasil validasi makroskopis dan mikroskopis pengecatan *Masson fontana* pada jaringan kulit mencit didapatkan gambaran seperti pada berikut:



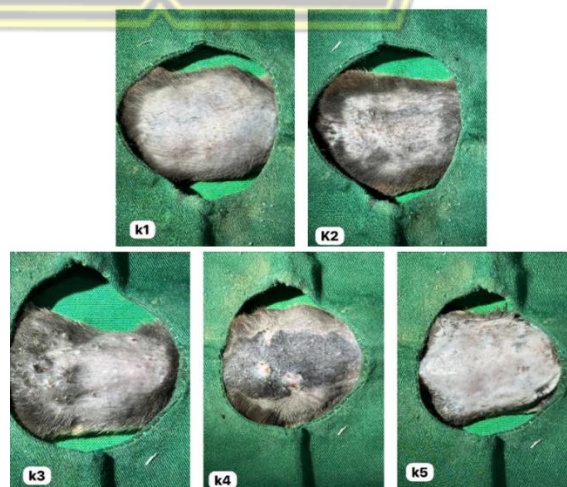
Gambar 5.4 (A) Jaringan kulit tanpa paparan UVB, (B) Jaringan kulit yang dipapar UVB, (C) Histologi jaringan kulit tanpa paparan UVB, (D) Histologi jaringan kulit yang dipaparan UVB.

Validasi jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi dilakukan secara makroskopis untuk mengamati perubahan warna kulit secara visual setelah paparan UVB dan secara mikroskopis dengan pengecatan *Masson fontana* untuk mendeteksi melanin dalam jaringan histologis, memvisualisasikan pigmen melanin, karena melanin memiliki sifat kimia

yang memungkinkan pengendapan logam berat, melanin mereduksi larutan perak nitrat menjadi perak metalik, yang mengendap dan tampak hitam di bawah mikroskop. Hasil validasi mengkonfirmasi pada jaringan kulit mencit terjadi hiperpigmentasi, sehingga model hiperpigmentasi ini valid.

5.1.3 Hasil gambaran makroskopis jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi setelah perlakuan

Perlakuan menggunakan kombinasi EH-MSC dan glutathione dengan vitamin C pada kulit mencit model hiperpigmentasi memengaruhi warna, tekstur, dan kondisi fisik kulit. Penurunan Pigmentasi warna kulit (Re-pigmentasi), area yang awalnya hiperpigmentasi menjadi lebih cerah dibandingkan sebelum perlakuan, selama periode pemantauan, perubahan warna terlihat secara bertahap, warna kulit menjadi lebih merata dibandingkan kelompok kontrol hiperpigmentasi. Gambaran hasil makroskopis seperti pada gambar berikut:



Gambar 5.5 Gambaran makroskopis setiap kelompok pada jaringan kulit mencit setelah perlakuan

Perlakuan kombinasi eksosom, glutathione, dan vitamin C pada kulit mencit memberikan efek sinergis dalam mengurangi pigmentasi, memperbaiki tekstur kulit, dan meningkatkan regenerasi kulit. Komponen ini bekerja secara sinergis mempercepat perbaikan hiperpigmentasi sekaligus meningkatkan kesehatan kulit secara keseluruhan, dimana eksosom meregenerasi sel kulit dan mengurangi peradangan, glutathione mengurangi produksi melanin dan melindungi dari stres oksidatif, dan vitamin C meningkatkan efek pencerahan kulit dan memperbaiki struktur jaringan.

5.1.4 Efek injeksi *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH-MS) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen TGF- β

Hasil penelitian didapatkan analisis ekspresi gen TGF- β dengan kombinasi injeksi EH-MS, glutathione dan vitamin C lebih rendah pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi. Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada tabel 5.2. Rata rata ekspresi TGF- β terendah terdapat pada kelompok K5 dengan nilai TGF- β $1,00 \pm 0,20$ dan ekspresi TGF- β paling tinggi pada kelompok K2 $2,72 \pm 0,64$. Terlampir pada tabel 5.1 sebagai berikut.

Tabel 5.1 Data hasil analisis statistik ekspresi gen TGF- β

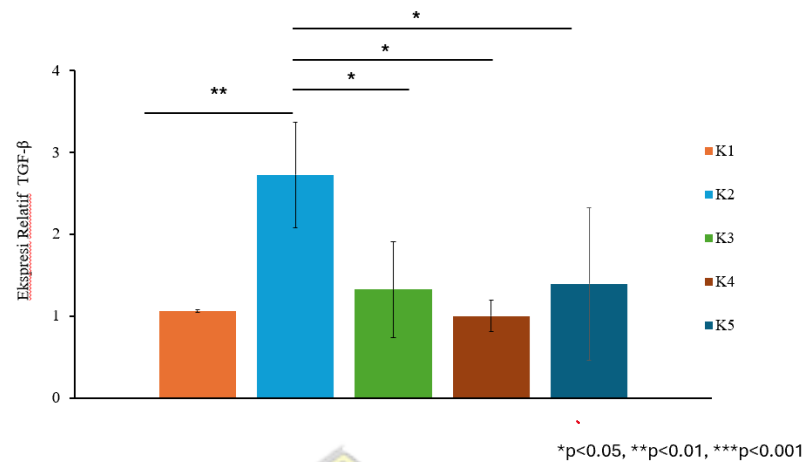
Variabel	Kelompok					p
	K1 Rerata $\pm$ SD	K2 Rerata $\pm$ SD	K3 Rerata $\pm$ SD	K4 Rerata $\pm$ SD	K5 Rerata $\pm$ SD	
Ekspresi gen TGF- β	1,05 $\pm$ 0,02	2,72 $\pm$ 0,64	1,32 $\pm$ 0,58	1,00 $\pm$ 0,20	1,40 $\pm$ 0,92	
<i>Saphiro wilk</i>	0,135	0,392	0,011	0,764	0,224	
<i>Levene's Test</i>						0,001
<i>Kruskal Wallis</i>						0,011

Keterangan:

- *Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)
- *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)
- *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

Hasil ekspresi gen TGF- β tidak terdistribusi normal, ditunjukkan pada kelompok K3 0,011 $p > 0,05$ yang diperoleh dengan uji *Shapiro Wilk*. Selain itu, varian data juga tidak homogen dengan hasil uji *Levene's Test* yang ditunjukkan dengan nilai $p = 0,001$ ($p > 0,05$). Distribusi dan varian data ekspresi gen TGF- β didapatkan tidak normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik non-parametrik dengan uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai $p = 0,011$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan signifikan diantara semua kelompok perlakuan. Hasil statistik uji *Kruskal Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat antar 2 kelompok yang memiliki perbedaan pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

Pada penelitian ini di dapatkan rata rata ekspresi TGF- β tertinggi pada kelompok K2 2,72 $\pm$ 0,64, pada kelompok K3 lebih rendah yaitu 1,32 $\pm$ 0,58 dan kelompok K4 dengan nilai 1,00 $\pm$ 0,20, dan kelompok K5 ekspresi gen TGF- β lebih tinggi dengan nilai sebesar 1,40 $\pm$ 0,92 (gambar 5.4).



Gambar 5.6 Grafik ekspresi TGF- β pada tiap kelompok perlakuan

Hasil statistik non-parametrik uji *Kruskal wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk membandingkan antar dua kelompok perlakuan. Hasil analisis tabel 5.2 menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok K2, dengan kelompok perlakuan K3, K4 dan K5.

Tabel 5.1 Uji Mann Whitney ekspresi TGF- β pada masing-masing kelompok

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,004*	0,334	0,627	0,334
K2	-	-	0,010*	0,004*	0,016*
K3	-	-	-	0,629	0,688
K4	-	-	-	-	0,423

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Perbandingan antara kelompok K1 beda bermakna dibandingkan kelompok K2, kelompok K2 beda bermakna dibandingkan kelompok K3, kelompok K2 beda bermakna dibandingkan kelompok K4,

kelompok K2 beda bermakna dibandingkan kelompok K5, ekspresi TGF- β lebih rendah pada kelompok K3, K4 dan K5 namun memiliki perbedaan yang tidak bermakna.

5.1.5 Efek injeksi exosome mesenchymal stem cell hypoxia (EH-MSc) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi MITF

Hasil analisis kombinasi injeksi EH-MSc dan glutathione dengan vitamin C lebih rendah terhadap ekspresi MITF pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi. Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.3. rata rata ekspresi MITF paling tinggi terdapat pada kelompok K4 dengan nilai MITF $1,28 \pm 0,97$, dan rata rata ekspresi MITF terendah terdapat pada kelompok K3 dengan nilai MITF $0,36 \pm 0,17$ Terlampir pada tabel 5.1 sebagai berikut.

Tabel 5.2 Data hasil analisis statistik ekspresi gen MITF

Variabel	Kelompok					p
	K1 Rerata $\pm$ SD	K2 Rerata $\pm$ SD	K3 Rerata $\pm$ SD	K4 Rerata $\pm$ SD	K5 Rerata $\pm$ SD	
Ekspresi gen MITF	$1,06 \pm 0,27$	$1,11 \pm 0,38$	$0,36 \pm 0,17$	$1,28 \pm 0,97$	$0,66 \pm 0,48$	
<i>Saphiro wilk</i>	0,093	0,457	0,831	0,067	0,320	
<i>Levene's Test</i>						0,001
<i>Oneway Anova</i>						0,035

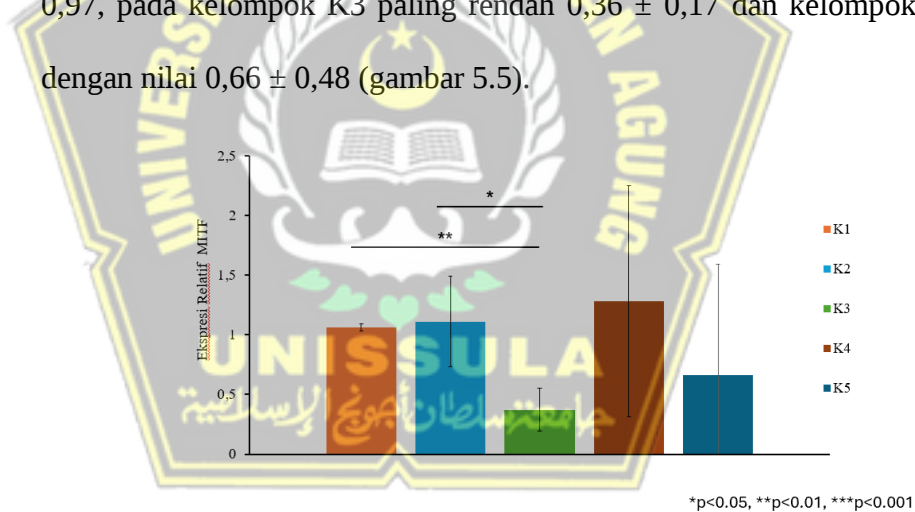
Keterangan:

- *Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)
- *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)
- One way Anova ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

Hasil ekspresi MITF semuanya terdistribusi normal, ditunjukkan oleh nilai $p > 0,05$ yang diperoleh dengan uji *Shapiro Wilk*. Selain itu, varian data yang tidak homogen dengan hasil uji *Levene's Test* yang

ditunjukkan dengan nilai $p=0,001$ ($p>0,05$). Distribusi dan varian data ekspresi gen MITF didapatkan normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *One Way Anova* didapatkan nilai $p=0,035$ ($p<0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan signifikan diantara semua kelompok penelitian. Hasil uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post hoc Tamhane* untuk melihat perbandingan antar dua kelompok pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

Hasil rata rata ekspresi MITF tertinggi pada kelompok K4 $1,28 \pm 0,97$, pada kelompok K3 paling rendah $0,36 \pm 0,17$ dan kelompok K5 dengan nilai $0,66 \pm 0,48$ (gambar 5.5).



Gambar 5.7 Grafik ekspresi MITF pada tiap kelompok penelitian

Hasil statistik parametrik uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk melihat perbandingan antar dua kelompok terhadap ekspresi MITF pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

Tabel 5.2 Uji *Post Hoc Tamhane* MITF pada masing-masing kelompok

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	1,000	0,002*	1,000	0,654
K2	-	-	0,034*	1,000	0,675
K3	-	-	-	0,514	0,897
K4	-	-	-	-	0,898

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Perbandingan antara dua kelompok K1 beda bermakna dibandingkan kelompok K3, kelompok K2 beda bermakna dibandingkan kelompok K3. Ekspresi MITF pada kelompok K3 lebih rendah jika dibandingkan kelompok K5, sedangkan kelompok K4 lebih tinggi terhadap ekspresi MITF pada kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

5.2 PEMBAHASAN

Hiperpigmentasi mengakibatkan peningkatan produksi atau penumpukan melanin pada kulit, pigmen alami yang memberikan warna pada kulit, kondisi ini menyebabkan area kulit menjadi lebih gelap dibandingkan warna kulit sekitarnya. TGF- β mempengaruhi proses melanogenesis (produksi melanin) pada melanosit, dengan mengurangi ekspresi enzim-enzim kunci yang terlibat dalam produksi melanin, seperti tirosinase. TGF- β menekan proliferasi melanosit, dan membantu mengendalikan pigmentasi berlebihan. TGF- β sebagai molekul reparatif dan regulator melanogenesis, mengurangi aktivitas

melanogenesis dengan menghambat ekspresi MITF dan menekan aktivitas melanosit.

TGF- β merupakan sitokin multifungsi yang berperan dalam berbagai proses seluler, termasuk penghambatan proliferasi melanosit serta penurunan produksi melanin. Ekspresi TGF- β yang meningkat dapat menghambat aktivitas melanosit, sehingga produksi melanin menurun dan hiperpigmentasi dapat berkurang. Sebaliknya, jika ekspresi TGF- β menurun, aktivitas melanosit meningkat, yang menyebabkan produksi melanin berlebih, sehingga memperparah kondisi hiperpigmentasi pada kulit.

MITF berperan dalam mengendalikan ekspresi enzim melanogenesis, sehingga perubahan ekspresi MITF akan langsung memengaruhi produksi melanin dan kondisi hiperpigmentasi kulit. Jika ekspresi MITF meningkat, maka ekspresi TYR, TYRP1, dan DCT juga meningkat, yang menyebabkan aktivitas melanogenesis meningkat serta produksi melanin bertambah, sehingga memperparah hiperpigmentasi. Sebaliknya, jika ekspresi MITF menurun, maka ekspresi TYR, TYRP1, dan DCT juga berkurang, mengakibatkan aktivitas melanogenesis menurun, sehingga produksi melanin berkurang dan hiperpigmentasi menjadi lebih terkendali. Agar hiperpigmentasi berkurang, ekspresi MITF harus ditekan, karena MITF merupakan faktor utama yang mengaktifkan enzim melanogenesis serta meningkatkan produksi melanin. Oleh karena itu, dalam strategi terapi atau intervensi untuk mengurangi hiperpigmentasi, salah satu pendekatan yang digunakan adalah menghambat

ekspresi MITF, baik melalui peningkatan TGF- β maupun modulasi jalur sinyal lain yang dapat menekan aktivasi MITF secara efektif.

Hasil penelitian menunjukkan ekspresi TGF- β lebih rendah pada semua kelompok perlakuan, kelompok yang diinjeksi EH-MSC didapatkan ekspresi TGF- β paling rendah. Hal ini disebabkan molekul bioaktif pada exosome seperti microRNA (miRNA), protein, dan lipid yang memiliki sifat anti-inflamasi. Molekul seperti miR-21, miR-146a, dan miR-155 yang terkandung dalam exosome dapat menghambat jalur inflamasi seperti NF- κ B, sehingga menekan peradangan di area hiperpigmentasi, dengan menekan inflamasi, produksi TGF- β yang biasanya meningkat sebagai respons terhadap stres inflamasi dapat ditekan.⁷⁹ Eksosom juga memiliki sifat antioksidan yang membantu mengembalikan keseimbangan mikrolingkungan kulit, mengurangi kebutuhan ekspresi TGF- β akibat stres inflamasi atau oksidatif yang diinduksi UVB.⁸⁰

Hasil penelitian mengungkapkan eksosom juga memodulasi ekspresi TGF- β , menyebabkan miofibroblas muncul sementara, mendorong kontraksi luka dan reorganisasi serat kolagen.⁸¹ Fibroblas yang berproliferasi berlebihan dan kolagen yang diendapkan berlebihan dapat mengakibatkan pembentukan jaringan parut. Sebaliknya, ADSC-exos mengurangi pengendapan kolagen setelah injeksi ke jaringan yang cedera secara in vivo, meningkatkan rasio kolagen III terhadap kolagen I, dan menghambat pengendapan berlebihan ECM dengan mengeluarkan Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), yang melemahkan pembentukan jaringan parut.⁸²⁻⁸⁴

Hasil penelitian pada kelompok kontrol negatif menunjukkan ekspresi gen tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa tanpa intervensi, kondisi mencit tetap memiliki tingkat ekspresi gen yang lebih baik, sedangkan perlakuan dengan EH-MSc, glutathione dan vitamin C justru menghasilkan ekspresi yang lebih rendah. Ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan dalam membahas hasil ini. Pertama, efektivitas dosis dan metode pemberian EH-MSc dan glutathione serta vitamin C harus dievaluasi. Mungkin dosis yang digunakan tidak cukup untuk memberikan efek yang signifikan atau waktu pemberian tidak memadai untuk melihat hasil yang diharapkan. Selain itu, perlu juga diperhatikan bahwa kombinasi antara EH-MSc, glutathione, dan vitamin C mungkin tidak berfungsi secara sinergis dalam mengurangi ekspresi gen TGF- β .

Mekanisme aksi dari masing-masing komponen juga penting untuk dianalisis. EH-MSc memiliki sifat antioksidan dan anti-inflamasi, tetapi jika tidak ada kerusakan oksidatif yang cukup pada kontrol negatif, maka efeknya mungkin tidak terlihat. Vitamin C sebagai antioksidan juga berperan dalam melindungi sel dari stres oksidatif, tetapi jika kadar glutathione sudah terpengaruh oleh faktor lain, hasilnya mungkin tidak optimal. Hasil penelitian ini memiliki implikasi penting untuk pengembangan terapi hiperpigmentasi. Meskipun kontrol negatif menunjukkan hasil terbaik, hal ini menunjukkan bahwa terapi yang diuji mungkin perlu disesuaikan atau dikombinasikan dengan pendekatan lain untuk mencapai hasil yang lebih baik.

Paparan UVB yang berulang dapat menyebabkan penurunan ekspresi TGF- β secara kronis. Hal ini dikaitkan dengan kerusakan akumulatif pada fibroblas,

penurunan kemampuan reparatif kulit, aktivasi jalur inflamasi kronis yang menghambat produksi TGF- β .⁸⁵ Stres oksidatif akibat radikal bebas dapat merusak mekanisme pengaturan gen yang mengontrol ekspresi TGF- β . Penurunan ekspresi TGF- β pada kejadian melanogenesis disebabkan oleh paparan UVB, inflamasi, deregulasi jalur sinyal, atau kondisi genetik. Faktor-faktor ini menghilangkan fungsi TGF- β sebagai penghambat melanogenesis.⁸⁶ Berbeda dengan hasil penelitian ini dimana ekspresi TGF- β menurun karena diberikan perlakuan EH-MS, glutathione dan vitamin C. Penurunan ekspresi TGF- β dalam melanogenesis umumnya terjadi akibat faktor eksternal seperti UVB, inflamasi, dan deregulasi sinyal, yang menghilangkan fungsinya sebagai penghambat produksi melanin. Namun, dalam penelitian ini, penurunan TGF- β terjadi akibat perlakuan EH-MS, Glutathione, dan Vitamin C, yang kemungkinan bekerja melalui modulasi sinyal seluler, efek antioksidan, atau mekanisme epigenetik, sehingga memengaruhi ekspresi TGF- β secara berbeda dibandingkan faktor eksternal.

Hasil penelitian menunjukkan hasil perlakuan injeksi exosome menghasilkan ekspresi gen MITF tertinggi, sementara perlakuan glutathione kombinasi vitamin C menghasilkan ekspresi terendah. Selain itu, kombinasi exosome dan glutathione serta vitamin C, memiliki ekspresi yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan yang hanya menggunakan exosome. Hasil ini menunjukkan bahwa exosome memiliki efek yang lebih kuat dalam meningkatkan ekspresi gen MITF dibandingkan kombinasi glutathione dan vitamin C. Hal ini dapat disebabkan oleh komponen spesifik dalam exosome yang berperan dalam regulasi gen MITF, sedangkan glutathione dan vitamin C mungkin tidak cukup efektif dalam konteks ini.

Exosome tidak cocok dikombinasikan karena perbedaan mekanisme molekuler, exosome mengandung berbagai biomolekul, seperti RNA, protein, dan faktor pertumbuhan, yang dapat mengaktifkan jalur sinyal tertentu yang berperan dalam meningkatkan ekspresi MITF, sehingga merangsang melanogenesis dan mempercepat produksi melanin. Sebaliknya, glutathione dan vitamin C berperan sebagai antioksidan yang membantu menghambat stres oksidatif serta menekan ekspresi MITF, yang justru mengurangi aktivitas melanogenesis. Perbedaan mekanisme ini menyebabkan adanya potensi efek antagonis antara exosome dan kedua antioksidan tersebut. Jika tujuan utama terapi adalah menekan hiperpigmentasi, maka exosome mungkin tidak cocok dikombinasikan dengan glutathione dan vitamin C, karena mekanisme kerja mereka yang berlawanan dalam regulasi MITF dapat mengurangi efektivitas terapi yang diinginkan. Dari data yang diperoleh, exosome memiliki efek yang lebih kuat dalam meningkatkan MITF dibandingkan kombinasi glutathione dan vitamin C, sehingga dalam konteks pengurangan hiperpigmentasi, kombinasi ini mungkin kurang efektif atau bahkan tidak cocok. Namun, kombinasi masih dapat dieksplorasi lebih lanjut dengan modifikasi formulasi atau dosis, untuk mencari keseimbangan efek yang diinginkan.

Penting untuk mengevaluasi dosis yang digunakan dalam penelitian. Dosis exosome yang lebih tinggi mungkin memberikan efek yang lebih baik dalam meningkatkan ekspresi gen MITF. Sebaliknya, dosis glutathione dan vitamin C mungkin tidak optimal atau tidak bekerja secara sinergis dengan exosome. Exosome dari MSCs diketahui mengandung berbagai sitokin dan faktor

pertumbuhan yang dapat mempengaruhi proses biologis di tingkat seluler. Penjelasan tentang bagaimana komponen dalam exosome berinteraksi dengan jalur sinyal yang mempengaruhi ekspresi MITF perlu dianalisis lebih lanjut. Di sisi lain, glutathione dan vitamin C sebagai antioksidan mungkin tidak cukup untuk mengatasi faktor-faktor yang mempengaruhi ekspresi gen dalam konteks hiperpigmentasi.

Glutathione dan vitamin C bekerja secara sinergis untuk mengurangi ekspresi MITF, berkontribusi pada mitigasi hiperpigmentasi melalui mekanisme pengurangan stres oksidatif pada melanosit yang disebabkan oleh radiasi UVB, dengan membersihkan ROS, mencegah kerusakan oksidatif yang biasanya meningkatkan jalur melanogenesis, termasuk aktivasi MITF, pengatur utama gen sintesis melanin seperti tirosinase dan protein terkait tirosinase (TYRP1 dan TYRP2). GSH memengaruhi keadaan redoks dalam melanosit, yang mendukung kondisi yang menurunkan melanogenesis.⁸⁷ GSH menurunkan ekspresi MITF dengan mempertahankan homeostasis redoks seluler.^{88,89} Vitamin C meningkatkan regenerasi GSH yang tereduksi dan berinteraksi secara langsung dengan jalur yang diatur MITF dengan menghambat aktivitas tirosinase. Peran ganda ini menekan melanogenesis sekaligus melindungi sel kulit dari kerusakan akibat sinar UV-B.^{7,90}

Hasil penelitian ini memiliki implikasi penting dalam pengembangan terapi untuk hiperpigmentasi. Meskipun kombinasi glutathione dan vitamin C sering dianggap bermanfaat, temuan ini menunjukkan bahwa pendekatan berbasis exosome mungkin lebih efektif. Oleh karena itu, rekomendasi untuk penelitian selanjutnya mencakup pengujian variasi dosis dari masing-masing perlakuan serta studi tentang kombinasi lain yang mungkin lebih baik. Selain itu, analisis

mendalam mengenai mekanisme aksi exosome terhadap ekspresi gen MITF akan sangat berguna untuk memahami interaksi biologis yang terjadi dan mengoptimalkan terapi di masa depan.

Dengan membahas hasil penelitian ini secara komprehensif dapat memperoleh pemahaman yang lebih baik tentang efektivitas berbagai perlakuan terhadap hiperpigmentasi serta potensi terapi baru menggunakan exosome mesenchymal stem cell hipoksia (EH-MSC).



BAB VI

KESIMPULAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

- 6.1.1 Terdapat pengaruh *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH- MSC) dan glutathione dengan vitamin C terhadap ekspresi gen TGF- β dan MITF mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.
- 6.1.2 Terdapat pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH- MSC) dosis 42 μ l dan glutathione dosis 6,24 μ l dengan vitamin C dosis 1,26 μ l terhadap ekspresi gen TGF- β antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.
- 6.1.3 Terdapat pengaruh pemberian *exosome mesenchymal stem cell hypoxia* (EH- MSC) dosis 42 μ l dan glutathione dosis 6,24 μ l dengan vitamin C dosis 1,26 μ l terhadap ekspresi gen MITF antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi.

6.2 Saran

Saran untuk penelitian berikutnya antara lain:

- 6.2.1 Melakukan pengujian variasi dosis dari masing-masing perlakuan untuk mengamati efektifitas tiap dosis terhadap perbaikan kulit hiperpigmentasi

6.2.1 Melakukan penelitian menggunakan kombinasi terapi lain yang lebih baik untuk dikombinasikan dengan exosome sehingga dapat meningkatkan efektivitas dalam mengatasi hiperpigmentasi.



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(5):874-883. doi:10.1002/ejp.1353
2. Moon HR, Jung JM, Kim SY, Song Y, Chang SE. TGF- β 3 suppresses melanogenesis in human melanocytes cocultured with UV-irradiated neighboring cells and human skin. *J Dermatol Sci*. 2020;99(2):100-108. doi:10.1016/j.jdermsci.2020.06.007
3. Zhou L, Shi YL, Li K, et al. Increased circulating Th17 cells and elevated serum levels of TGF-beta and IL-21 are correlated with human non-segmental vitiligo development. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28(3):324-329. doi:10.1111/pcmr.12355
4. Owolabi JO, Fabiyi OS, Adelakin LA, Ekwerike MC. Effects of skin lightening cream agents - hydroquinone and kojic acid, on the skin of adult female experimental rats. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020;13:283-289. doi:10.2147/CCID.S233185
5. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(10):924-931. doi:10.2340/00015555-3002
6. Meri M. PENGARUH PEMBERIAN INJEKSI EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEMCELLS TERHADAP KADAR GLUTATHIONE PEROXIDASE (GPx) DAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)(Studi Eksperimental In vivo pada Tikus Wistar Model Collagen Loss yang Diinduksi Sinar Ultraviolet B) (Doc. 2024;15(1):37-48.
7. Huang H, Zha M, Liu X, et al. Glutathione combined with mecobalamin in the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a retrospective clinical study. *Ann Palliat Med*. 2021;10(12):12335-12346. doi:10.21037/apm-21-3313
8. Darma S, Manjas M, Saputra D, Agus S, . E. Efek Pemberian Suntikan Subkutan Vitamin C Terhadap Luka Insisi Dermal. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2013;2(3):168. doi:10.25077/jka.v2i3.247
9. Cui HS, Joo SY, Cho YS, et al. Exosomes Derived from Hypertrophic Scar Fibroblasts Suppress Melanogenesis in Normal Human Epidermal Melanocytes. *Int J Mol Sci*. 2024;25(13). doi:10.3390/ijms25137236
10. Sasaninia K, Kelley M, Abnousian A, et al. Topical Absorption of Glutathione–Cyclodextrin Nanoparticle Complex in Healthy Human

- Subjects Improves Immune Response against Mycobacterium avium Infection. *Antioxidants*. 2023;12(7). doi:10.3390/antiox12071375
11. Boo YC. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. *Antioxidants*. 2022;11(9). doi:10.3390/antiox11091663
 12. Hu JC, Zheng CX, Sui BD, Liu WJ, Jin Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel and potential remedy for cutaneous wound healing and regeneration. *World J Stem Cells*. 2022;14(5):318-329. doi:10.4252/wjsc.v14.i5.318
 13. Prakoeswa CRS, Pratiwi FD, Herwanto N, et al. The effects of amniotic membrane stem cell-conditioned medium on photoaging. *Journal of Dermatological Treatment*. 2019;30(5):478-482. doi:10.1080/09546634.2018.1530438
 14. Kim MR, Lee HS, Choi HS, Kim SY, Park Y, Suh HJ. Protective effects of ginseng leaf extract using enzymatic extraction against oxidative damage of UVA-irradiated human keratinocytes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(4):933-945. doi:10.1007/s12010-014-0886-2
 15. Lu W, Zhang J, Wu Y, Sun W, Jiang Z, Luo X. Engineered NF- κ B siRNA-encapsulating exosomes as a modality for therapy of skin lesions. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1109381
 16. Zhao K, Kong C, Shi N, Jiang J, Li P. Potential angiogenic, immunomodulatory, and antifibrotic effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2023;14(May):1-13. doi:10.3389/fimmu.2023.1125257
 17. Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci*. 2018;210:201-208. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.056
 18. Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ, Chiang HM. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3 β -ol, Isolated from *Antrrodia camphorata*, on Hairless mouse skin. *Molecules*. 2016;21(9). doi:10.3390/molecules21091213
 19. Yokawa K, Kagenishi T, Baluška F. UV-B induced generation of reactive oxygen species promotes formation of BFA-induced compartments in cells of *Arabidopsis* root apices. *Front Plant Sci*. 2016;6(JAN2016). doi:10.3389/fpls.2015.01162
 20. Lingappan K. NF- κ B in oxidative stress. *Curr Opin Toxicol*. 2018;7:81-86. doi:10.1016/j.cotox.2017.11.002

21. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(4):994-1001. doi:10.1038/jid.2008.332
22. Su CM, Wang L, Yoo D. Activation of NF- κ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci Rep*. 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-92941-2
23. Wan S, Liu Y, Shi J, Fan D, Li B. Anti-Photoaging and Anti-Inflammatory Effects of Ginsenoside Rk3 During Exposure to UV Irradiation. *Front Pharmacol*. 2021;12. doi:10.3389/fphar.2021.716248
24. Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, et al. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med*. 2012;30(2):392-400. doi:10.3892/ijmm.2012.1011
25. Su VYF, Lin CS, Hung SC, Yang KY. Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ b pathway in endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9). doi:10.3390/ijms20092208
26. Trisnadi S, Muhar AM, Putra A, Kustiyah AR. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate peritoneal adhesion through TGF- β inhibition. *Universa Medicina*. 2020;39(2):97-104. doi:10.18051/univmed.2020.v39.97-104
27. 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(5):874-883. doi:10.1002/ejp.1353
28. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, et al. Screening for skin cancer US preventive services task force recommendation statement. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2016;316(4):429-435. doi:10.1001/jama.2016.8465
29. Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2009;4:551-579. doi:10.1146/annurev.pathol.3.121806.151541
30. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442

31. Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, D'Alcontres FS. ROS as Regulators of Cellular Processes in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/1208690
32. Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;174(3):299-306. doi:10.1016/j.resp.2010.08.019
33. Pittayapruuek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060868
34. Pankajakshan D, Agrawal DK. *Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration*.
35. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7(1). doi:10.1038/cddis.2015.327
36. Xia X, Chiu PWY, Lam PK, Chin WC, Ng EKW, Lau JYW. Secretome from hypoxia-conditioned adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the healing of gastric mucosal injury in a rodent model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(1):178-188. doi:10.1016/j.bbadis.2017.10.009
37. Jahandideh S, Khatami S, Eslami Far A, Kadivar M. Anti-inflammatory effects of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells secretome preconditioned with diazoxide, trimetazidine and MG-132 on LPS-induced systemic inflammation mouse model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup2):1178-1187. doi:10.1080/21691401.2018.1481862
38. Dokka S, Shi X, Leonard S, et al. *Interleukin-10-Mediated Inhibition of Free Radical Generation in Macrophages*. Vol 280. <http://www.ajplung.org>
39. Kim YW, Byzova T V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. Published online 2014. doi:10.1182/blood
40. Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol*. 2004;135:64-73. doi:10.1046/j.1365-2249.2004.02342.x
41. Tanaka K, Asamitsu K, Uranishi H, et al. *Protecting Skin Photoaging by NF-B Inhibitor*. Vol 11.; 2010.
42. Oh JE, Kim MS, Jeon WK, et al. A nuclear factor kappa B-derived inhibitor tripeptide inhibits UVB-induced photoaging process. *J Dermatol Sci*. 2014;76(3):196-205. doi:10.1016/j.jdermsci.2014.10.002

43. Chen S, He Z, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in photoaging: basic science and literature review. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):1-15. doi:10.1186/s13287-020-01994-z
44. Balasubramanian S, Thej C, Walvekar A, et al. Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.* 2017;07(01):99-117. doi:10.4236/jcdsa.2017.71010
45. Kim YJ, Seo DH, Lee SH, et al. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochem Biophys Rep.* 2018;16:96-102. doi:10.1016/j.bbrep.2018.10.007
46. Robert AW, Azevedo Gomes F, Rode MP, et al. The skin regeneration potential of a pro-angiogenic secretome from human skin-derived multipotent stromal cells. *J Tissue Eng.* 2019;10. doi:10.1177/2041731419833391
47. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina.* 2019;38(3):164-171. doi:10.18051/univmed.2019.v38.164-171
48. Li L, Ngo HTT, Hwang E, et al. Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents uvb-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1). doi:10.3390/ijms21010049
49. Hanke J. *ROLE OF NFκB AND BCL-2 IN IGFBP-3 MEDIATED INTRINSIC APOPTOSIS.*; 2017.
50. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
51. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, et al. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(7):850-859. doi:10.1016/j.bcp.2006.06.021
52. Yao C, Lee DH, Oh JH, et al. Poly(I : C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2015;80(1):54-60. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.06.017
53. Kuo YH, Chen CW, Chu Y, Lin P, Chiang HM. In vitro and in vivo studies on protective action of N-phenethyl caffeamide against photodamage of skin. *PLoS One.* 2015;10(9). doi:10.1371/journal.pone.0136777

54. Cooper SJ, Bowden GT. *Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of Nuclear Factor-Kappa B (NF-KB) and Activator Protein-1 (AP-1) in UVB-Induced Skin Carcinogenesis*. Vol 7.; 2007.
55. 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(6). doi:10.3390/nu11061341
56. Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, et al. Interleukin-6: Molecule in the intersection of cancer, ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):1-25. doi:10.3390/ijms21217937
57. Wölflle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(9):1081-1093. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.027
58. 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(1):65-74. doi:10.1016/j.arr.2013.12.001
59. Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol*. 2019;28:23-27. doi:10.1111/exd.13818
60. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1). doi:10.1101/cshperspect.a015370
61. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol*. 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/930164
62. *Overview of Skin Aging and Photoaging DERMATOLOGY NURSING*. www.dermatologynursing.net
63. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(2):87-95. doi:10.1111/j.1468-2494.2007.00415.x
64. Hwang KA, Yi BR, Choi KC. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations . *Lab Anim Res*. 2011;27(1):1. doi:10.5625/lar.2011.27.1.1
65. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, 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(2):218-226. doi:10.15283/ijsc18034

66. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol.* 2019;10(JUN). doi:10.3389/fimmu.2019.01191
67. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep.* 2016;2(2):168-173. doi:10.1007/s40778-016-0044-6
68. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9). doi:10.3390/ijms19092783
69. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, et al. Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(3):305-310. doi:10.3889/oamjms.2019.049
70. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014;12(1). doi:10.1186/s12967-014-0260-8
71. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells.* 2019;8(5). doi:10.3390/cells8050467
72. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1):1-14. doi:10.1101/cshperspect.a015370
73. Markiewicz E, Karaman-Jurukovska N, Mammone T, Idowu OC. Post-Inflammatory Hyperpigmentation in Dark Skin: Molecular Mechanism and Skincare Implications. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2022;15(November):2555-2565. doi:10.2147/CCID.S385162
74. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):4066-4087. doi:10.3390/ijms10094066
75. Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, et al. Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats. *Open Access Maced J Med Sci.* 2022;10(A):1-7. doi:10.3889/oamjms.2022.10348
76. Ibrahim MM, Bond J, Bergeron A, et al. A novel immune competent murine hypertrophic scar contracture model: A tool to elucidate disease mechanism and develop new therapies. *Wound Repair and Regeneration.* 2014;22(6):755-764. doi:10.1111/wrr.12238

77. Oh M, Lee J, Kim YJ, Rhee WJ, Park JH. Exosomes derived from human induced pluripotent stem cells ameliorate the aging of skin fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1-18. doi:10.3390/ijms19061715
78. Wang T, Jian Z, Baskys A, et al. MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system. *Biomaterials*. 2020;257(April):120264. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120264
79. Lee JM, Lee JO, Kim Y, et al. Anti-melanogenic effect of exosomes derived from human dermal fibroblasts (BJ-5ta-Ex) in C57BL/6 mice and B16F10 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2024;37(2):232-246. doi:10.1111/pcmr.13135
80. Sun Y, Zhang S, Shen Y, et al. Therapeutic application of mesenchymal stem cell-derived exosomes in skin wound healing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024;12(August):1-13. doi:10.3389/fbioe.2024.1428793
81. SUNDELL CG. Tissue Engineering and Regenerative Medicine T ISSUE E NGINEERING AND R EGENERATIVE M EDICINE Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNAs Suppress Myofibroblast Differentiation by Inhibiting the Transforming Growth Factor- β / γ . *Sven Lakartidn*. 1957;54(22):1859-1861. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13455520>
82. Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep*. 2016;6(March):1-11. doi:10.1038/srep32993
83. Li Y, Zhang J, Shi J, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells attenuate hypertrophic scar fibrosis by miR-192-5p/IL-17RA/Smad axis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):1-16. doi:10.1186/s13287-021-02290-0
84. Wang L, Hu L, Zhou X, et al. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-12. doi:10.1038/s41598-017-12919-x
85. Han SH, Ballinger E, Choung SY, Kwon JY. Anti-Photoaging Effect of Hydrolysates from Pacific Whiting Skin via MAPK/AP-1, NF- κ B, TGF- β /Smad, and Nrf-2/HO-1 Signaling Pathway in UVB-Induced Human Dermal Fibroblasts. *Mar Drugs*. 2022;20(5):1-15. doi:10.3390/md20050308
86. Fu C, Chen J, Lu J, et al. Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol Med Rep*. 2020;21(3):1421-1430. doi:10.3892/mmr.2020.10950

87. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32(2):224-236. doi:10.1111/pcmr.12726
88. Sinee W, Siriwan T, Phanupong P, Praavit A. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* Published online 2017:147-153.
89. Nazhan Mahmood M. The Effectiveness of Glutathione on Skin Lightening: A Review. *Int J Med Sci.* 2022;5(2):2522-7386. <http://doi.org/10.32441.ijms.5.2.2>
90. Cui X, Mi T, Zhang H, et al. Glutathione amino acid precursors protect skin from UVB-induced damage and improve skin tone. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2024;38(S3):12-20. doi:10.1111/jdv.19718

