

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME*
MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA
TERHADAP EXPRESI GEN FGF DAN TRP**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL Jantan
Hiperpigmentasi yang Diinduksi Sinar UV-B yang dihasilkan oleh
perangkat UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12)**

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister Ilmu Biomedik



**Siti Cholifah
MBK 23.21.010377**

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

2024

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME*
MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA
TERHADAP EXPRESI GEN FGF DAN TRP**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL Jantan
Hiperpigmentasi yang Diinduksi Sinar UV-B yang dihasilkan oleh perangkat
UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12)**

Diajukan oleh :

Siti Cholifah

MBK 23.21.010377

Telah disetujui oleh :

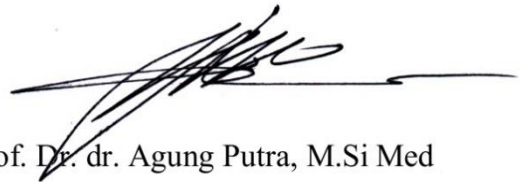
Pembimbing I,



Prof. Dr. dr. Dedy Hermansyah, Sp.B. Subsp. Onk (K)

NIP. 198107032009121003

Pembimbing II,



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

NIK. 210199050

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Unissula



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B

NIK. 210113160

PERNYATAAN

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

Probolinggo, Oktober 2024

Siti Cholifah
MBK 2321010377

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah sehingga penulis mampu menyelesaikan proposal tesis ini dengan judul “ **PENGARUH PEMBERIAN EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA TERHADAP EXPRESI FGF dan TRP (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL Jantan Hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12)** ”. Penyusunan proposal tesis ini sebagai salah satu syarat kelulusan dalam jenjang pendidikan Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH.,M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para Wakil Rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang
3. Dr.dr.Eko Setiawan,Sp.B.,Finacs selaku Kepala Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang
4. Prof. Dr. dr. Dedy Hermansyah,Sp.B,Supsp Onk(K) selaku pembimbing I
5. Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi.Med selaku pembimbing II

6. Penguji I Dr.dr.Chodidjah,M.Kes
7. Penguji II Dr.dr.Setyo Trisnadi,Sp.KF ,SH
8. Penguji III Dr.dr.Eko Setiawan,Sp.B
9. Kepada orang tua yang senantiasa mendukung serta mendoakan
10. Kepada suami tercinta Diky Fitra Nanjar, anak kami Kayyisah Himamy Hafshawaty, Moh. Azmi Arkan Maulana, Saesha Shafiyah Almeera yang senantiasa mendukung serta mendoakan
11. Segenap staf Stem Cell & Cancer Research (SCCR)
12. Segenap staf administrasi program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
13. Teman-teman program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang
14. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan Proposal ini, terimakasih atas dukungannya. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan proposal penelitian ini.

Probolinggo, Oktober 2024

Siti Cholifah
MBK 23.21.010377

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
ABSTRAK	xvii
ABSTRACT	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.3.1. Tujuan Umum	6
1.3.2. Tujuan Khusus	7
1.4. Manfaat penelitian	7
1.4.1. Manfaat Teoritis	7
1.4.2. Manfaat Praktis	7
1.5. Originalitas Penelitian	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	13
2.1. Fibroblast Growth Factor (FGF)	13
2.2. Transient Receptor Potential (TRP)	16
2.3. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs)	17
2.3.1. Definisi MSCs	17
2.3.2. Sumber MSCs	18
2.3.3. Karakteristik MSCs	19

2.3.4.	Peran MSCs	20
2.4.	<i>Exosome</i> MSCs.....	21
2.5.	<i>Collagen</i>	21
2.5.1.	Definisi.....	21
2.5.2.	Perubahan pada <i>collagen</i>	24
2.5.3.	Mekanisme kerusakan <i>collagen</i>	26
2.5.4.	Sintesis <i>Collagen</i>	27
2.5.5.	Sintesis <i>Procollagen</i>	27
2.6.	Paparan Sinar UVB terhadap Hiperpigmentasi	31
2.7.	Efek <i>Exosome</i> MSCs terhadap Ekspresi Gen FGF dan TRP pada mencit jantan yang dipapar Sinar UV-B.....	33
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		35
3.1.	Kerangka Teori.....	35
3.2.	Kerangka Konsep	39
3.3.	Hipotesis.....	39
BAB IV METODE PENELITIAN.....		40
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	40
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	42
4.2.1.	Variabel Penelitian.....	42
4.2.2.	Defenisi Operasional.....	42
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	45
4.3.1.	Subjek Penelitian	45
4.3.2.	Sampel Penelitian	45
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	46
4.3.4.	Besar Sampel	46
4.4.	Alat dan Bahan	47
4.4.1.	Alat.....	47
4.4.2.	Bahan	48
4.5.	Cara Penelitian.....	48
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	48
4.5.2.	Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> ..	49

4.5.3. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i>	50
4.5.4. Isolasi <i>Exosome</i> MSCs hypoxia	52
4.5.5. Penyinaran UV-B dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	53
4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan.....	54
4.5.7. Pembuatan Blok Parafin.....	54
4.5.8. Validasi Hiperpigmentasi Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan.....	55
4.5.9. Analisis Kuantitatif Ekspresi gen FGF dan TRP menggunakan RT-PCR	57
4.6. Langkah Penelitian	58
4.7. Tempat dan Waktu Penelitian	60
4.8. Analisis Data	60
4.9. Alur Penelitian.....	61
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	62
5.1. Hasil Penelitian.....	63
5.1.1. Hasil Validasi MSCs	63
5.1.2. Efek Pemberian E-MSCs terhadap Ekspresi Gen FGF	67
5.1.3. Efek Pemberian E-MSCs terhadap Ekspresi Gen TRP	70
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	73
5.3. Keterbatasan Penelitian.....	75
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	76
6.1. Kesimpulan.....	76
6.2. Saran	76
DAFTAR PUSTAKA	77
LAMPIRAN	89

DAFTAR SINGKATAN

AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
EHMSC	: <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-γ</i>
MIP-1 α	: <i>Macrophage Inflammatory Protein 1α</i>
MiRNA	: <i>Micro-RNA</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
MyD88	: <i>Myeloid Differentiation primary response protein-88</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
TLR	: <i>Toll-like receptor</i>
UC-MSC-Derived Exosome	: <i>Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Derived Exosome</i>
JNK	: <i>C-Jun NH2-terminal Kinase</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metallo Proteinase</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UV-B	: <i>Ultraviolet-B</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
pRb	: <i>Protein Retinoblastoma</i>
SASP	: <i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
CD9	: <i>Cytoplasmic Domain 9</i>
CD63	: <i>Cytoplasmic Domain 63</i>
CD81	: <i>Cytoplasmic Domain 81</i>
HSP60	: <i>Heat Shock Protein 60</i>

HSP70	: <i>Heat Shock Protein 70</i>
TRIF	: <i>TIR domain-containing adaptor inducing interferon-B</i>
HSP90	: <i>Heat Shock Protein 90</i>
Alix	: <i>ALG-2-Interacting protein X</i>
TSG101	: <i>Tumor Suppressor Protein Gen 101</i>
E-MSCs	: <i>Exosome-MSCs</i>
C-Fos	: <i>Oncogen Celuler Fos</i>
C-Jun	: <i>Protein Complex Jun</i>
EHMT	: <i>Enzyme Histone Methyl Transferase</i>
Cdh1	: <i>Gen E-cadherin 1</i>
RAS	: <i>Rat Sarcoma</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
CXCL-1	: <i>CXC motif chemokine Ligand 1</i>
CCL-2	: <i>CC motif Ligand 2</i>
MYC	: <i>Myelocytomatosis</i>
α-SMA	: <i>Alpha-SM-Actin</i>
PCNA	: <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
RAF	: <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
MDM2	: <i>Murine Double Minute 2</i>
GADD45	: <i>Growth Arrest and DNA-Damage inducible gene 45</i>
Chk1/2	: <i>Checkpoint Kinase 1 and 2</i>
Cdc25A	: <i>Cell Division Cycle 25A</i>
ESC	: <i>Endometrial Stromal Cells</i>
EEC	: <i>Entero Endocrine Cells</i>

SMAD2/3	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2 and 3</i>
SMAD4	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 4</i>
GAPDH	: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
PBS	: <i>Phospat Buffer Saline</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
PCR-RFLP	: <i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
TRP	: <i>Tyrosinase-Related Protein</i>
Kaep1	: <i>Kelch- like ECH- associated protein 1</i>
MITF	: <i>Microphthalmia Associated Transcription Factor</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HLT	: <i>Hidroksilasi L-Tyrosine</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine</i>
EVs	: <i>Vesikel Exstraseluler</i>
FGFR	: <i>Reseptor Fibroblast Growth Factor</i>
HS	: <i>Heparan Sulfat</i>
STAT-3	: <i>A Signal Transducer and Activator of Transcription-3</i>
PKB/Akt	: <i>Protein Kinase B (Akt) Pathway</i>
HLT	: <i>Hidroksilasi L-Tyrosine</i>
TGF-BMSC	: <i>Transforming Growth Factor- Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells</i>
M1/M2	: <i>Macrofag 1/ Macrofag 2</i>
S1P	: <i>Sfingosin 1- Fosfat</i>
PLC γ	: <i>Caskade Phosfolipase Cγ (PLCγ)</i>
ARG-1	: <i>Arginase-1</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Peran FGF dalam proses perbaikan jaringan.....	15
Gambar 2.2.	Struktur Operon TRP	17
Gambar 2.3.	Sumber <i>mesenchymal stem cell</i> (MSCs)	19
Gambar 2.4.	Kemampuan diferensiasi dari MSCs	20
Gambar 2.5.	Perbedaan <i>Collagen</i> Pada Kulit Muda dan Kulit Tua. Jumlah <i>Collagen</i> pada kulit yang lebih muda lebih banyak dibandingkan kulit yang lebih tua	22
Gambar 2.6.	Sintesis <i>Collagen</i>	30
Gambar 2.7.	<i>Procollagen</i>	31
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	38
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep.....	39
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian	41
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	61
Gambar 5.1.	A) Mencit kelompok sehat warna kulit normal, (B) Mencit yang diberi paparan UVB terlihat kulit berwarna gelap, (C) Pigmen melanin normal pada mencit sehat, (D) Pigmen melanin mencit yang terpapar UVB sudah mengalami hiperpigmentasi.....	63
Gambar 5.2.	Karakter morfologi sel hasil Isolasi. Morfologi sel hasil Isolasi memiliki karakter seperti MSC yaitu berbentuk bulat lonjong inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol (fibroblas-like) dengan perbesaran mikroskop 100x (a) dan perbesaran 200x (b). Scale bar: 50µm.....	65
Gambar 5.3.	Kemampuan diferensiasi sel hasil isolasi. (a) Sel hasil Isolasi mampu berdiferensiasi menjadi <i>osteocyte</i> pada pengamatan pewarnaan <i>Alizarin red</i> dan (b) berdiferensiasi menjadi <i>adipocyte</i> pada pengamatan pewarnaan <i>Oil Red dye</i> pada pembesaran 400x. *Panah kuning: menunjukkan deposisi kalsium, panah hitam: menunjukkan lipid droplet.....	65
Gambar 5.4.	Hasil analisis flowcytometry sel hasil isolasi. Sel hasil Isolasi	

	memiliki ekspresi CD90.1 dan CD29 yang tinggi serta ekspresi CD45 dan CD31 yang rendah.....	66
Gambar 5.5.	Hasil analisis flowcytometry Exosome-MSC. Exosome MSCs membentuk populasi yang positif C81 dan CD63, serta positif CD9 sebesar 9.1%.....	66
Gambar 5.6.	Ekspresi Relatif gen FGF pada jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi pada semua kelompok. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$	70
Gambar 5.7.	Ekspresi Relatif mRNA TRP pada jaringan kulit mencit model Hiperpigmentasi pada semua kelompok. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$	73



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian	9
Tabel 4.1.	Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i>	51
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada ekspresi FGF dan ekspresi TRP	67
Tabel 5.2.	Perbedaan Ekspresi FGF Antar 2 Kelompok	68
Tabel 5.3.	Perbedaan Ekspresi TRP Antar 2 Kelompok	71



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	89
Lampiran 2. Surat Keterangan Penelitian	90
Lampiran 3. Hasil Analisis	91
Lampiran 4. Hasil Data SPSS.....	93
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian.....	106



ABSTRAK

Latar Belakang : Radiasi UVB merupakan faktor utama penyebab hiperpigmentasi. Exosome mesenchymal stem cells (E-MSCs) mengandung soluble molecule bioaktif seperti growth factor dan sitokin anti-inflamasi yang mampu mencegah sintesis melanin. Hingga saat ini peran E-MSCs terhadap ekspresi gen FGF dan TRP pada pembentukan melanin masih belum jelas.

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian E-MSCs terhadap ekspresi gen FGF dan TRP pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB Narrowband tipe TLF72-100W/12 .

Metode : Penelitian eksperimental dengan post test control group design. Kelompok penelitian terdiri dari kelompok Sham, kontrol negatif NaCl 0,9%, kontrol positif injeksi retinol 200 μ L, E-MSCs 200 μ L dan E-MSCs 300 μ L yang diadministrasikan secara subcutan. Mencit C57BL diinduksi paparan sinar UVB dengan MED 160 mJ/cm² selama 9 menit/ hari dengan jarak 20cm selama 3 kali seminggu sepanjang 2 minggu. Perlakuan terapi diberikan pada hari ke-15 dan pada hari ke-21 dilakukan terminasi hewan uji. Analisis ekspresi gen TRP dan FGF menggunakan qRT-PCR. Perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistika dengan one way ANOVA (FGF) dan Kruskal Wallis (TRP) yang dilanjutkan uji beda perkelompok menggunakan Mann whitney (FGF) dan post hoc LSD (TRP).

Hasil : Analisa ekspresi gen FGF mengalami peningkatan tertinggi pada kelompok E-MSCs 300 μ L ($4,87 \pm 2,51$) diikuti kelompok E-MSCs 200 μ L ($3,69 \pm 1,46$), sedangkan kelompok kontrol negatif memiliki nilai ekspresi gen FGF terendah sebesar ($0,68 \pm 0,46$). Pada ekspresi gen TRP kelompok E-MSCs 300 μ L memiliki nilai ekspresi gen TRP terendah ($0,22 \pm 0,10$) dan pada kelompok kontrol negatif memiliki nilai ekspresi gen TRP tertinggi ($1,07 \pm 0,52$).

Kesimpulan : Pemberian E-MSCs berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan proses hiperpigmentasi dengan mengatur regulasi ekspresi gen TRP dan FGF.

Kata Kunci : TRP, FGF, E-MSCs, Hiperpigmentasi.

ABSTRACT

Background: UVB radiation is the main factor causing hyperpigmentation. Exosome mesenchymal stem cells (E-MSCs) contain soluble bioactive molecules such as growth factors and anti-inflammatory cytokines that can prevent melanin synthesis. Until now, the role of E-MSCs on FGF and TRP gene expression in melanin formation is still unclear.

Objective: This study aims to determine the effect of E-MSCs on FGF and TRP gene expression in the skin of mice with a hyperpigmentation model induced by exposure to Narrowband UVB light type TLF72-100W/12.

Methods: Experimental study with post-test control group design. The study groups consisted of the Sham group, 0.9% NaCl negative control, 200 μ L retinol injection positive control, 200 μ L E-MSCs and 300 μ L E-MSCs administered subcutaneously. C57BL mice were induced by UVB exposure with MED 160 mJ/cm² for 9 minutes/day at a distance of 20cm for 3 times a week for 2 weeks. Therapeutic treatment was given on the 15th day and on the 21st day the test animals were terminated. Analysis of TRP and FGF gene expression using qRT-PCR. Differences between treatment groups were analyzed statistically using one-way ANOVA (FGF) and Kruskal Wallis (TRP) which were continued with group difference tests using Mann Whitney (FGF) and post hoc LSD (TRP). Results: FGF gene expression analysis experienced the highest increase in the 300 μ L E-MSCs group (4.87 ± 2.51) followed by the 200 μ L E-MSCs group (3.69 ± 1.46), while the negative control group had the lowest FGF gene expression value of (0.68 ± 0.46). In the TRP gene expression, the 300 μ L E-MSCs group had the lowest TRP gene expression value (0.22 ± 0.10) and the negative control group had the highest TRP gene expression value (1.07 ± 0.52).

Results: FGF gene expression analysis experienced the highest increase in the 300 μ L E-MSCs group (4.87 ± 2.51) followed by the 200 μ L E-MSCs group (3.69 ± 1.46), while the negative control group had the lowest FGF gene expression value of (0.68 ± 0.46). In the TRP gene expression, the 300 μ L E-MSCs group had the lowest TRP gene expression value (0.22 ± 0.10) and the negative control group had the highest TRP gene expression value (1.07 ± 0.52).

Conclusion: Administration of E-MSCs had a significant effect on reducing the hyperpigmentation process by regulating the expression of TRP and FGF genes.

Keywords: TRP, FGF, E-MSCs, Hyperpigmentation.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Irradiasi *Ultraviolet* (UV) dianggap sebagai salah satu faktor eksternal berbahaya, yang mengakibatkan perubahan fisik dan kimia pada organisme hidup.^{1,2} Paparan sinar UV-B menginduksi terjadinya stress oksidatif yang ditandai dengan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Penumpukan kadar ROS di kulit akibat UV-B menginduksi terjadinya kerusakan DNA pada sel fibroblast dan keratinosit. Paparan kronik sinar *Ultraviolet-B* (UV-B) menimbulkan peningkatan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berdampak pada penurunan jumlah *collagen* di kulit.³⁻⁴ Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa 82% orang berusia dibawah 30 tahun mengalami penurunan *collagen* akibat paparan UV-B yang berakibat munculnya kerutan dan penurunan elastisitas kulit.⁵ Peningkatan kadar ROS dapat menginduksi menghambat fosforilasi *Protein Kinase B (Akt) Pathway*^{6,7}. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *Exosome Mesenchymal Stem Cells* (E-MSCs) mengandung berbagai sitokin dan *Growth Factors* (GF) yang dapat menekan stress oksidatif, mencegah hiperpigmentasi akibat UV-B^{8,9}, dan mencegah fibrosis pada luka. Paparan sinar UV-B secara berlebih menyebabkan perubahan dalam struktur dan fungsi kulit yang menyebabkan *sunburn*, *tanning* dan hiperpigmentasi, sampai pada efek samping kronis seperti photoaging dan kanker kulit.¹⁰

Hiperpigmentasi merupakan salah satu tanda penuaan kulit akibat peningkatan jumlah melanin yang berdampak terhadap pembentukan pigmen berwarna hitam dan terjadinya kerutan.¹¹ Melanin adalah faktor utama penentu warna kulit, memberikan pertahanan terhadap efek berbahaya kerusakan kulit akibat sinar ultraviolet, ekspresi *Tyrosinase-Related Protein* (TRP) yang diatur oleh *Microphthalmia Associated Transcription Factor* (MITF) berperan penting dalam sintesis melanin.¹² Beberapa sitokin dan *Growth Factor* (GF) seperti *Fibroblast Growth Factor* (FGF) pada *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) mengatur Proliferasi, diferensiasi dan melanogenesis pada melanosit epidermal.¹³ E-MSCs yang diketahui memiliki efisiensi penetrasi kulit yang tinggi, dengan beragam molekul bioaktif didalamnya termasuk FGF, *Exosome* dapat memberikan manfaat kuratifnya melalui banyak mekanisme terapi yang berbeda secara bersamaan, sehingga menghasilkan efek biologis yang lebih baik dibandingkan senyawa molekul kecil.¹⁴ *Exosome-MSCs* mengandung komponen spesifik MSC untuk memberikan efek spesifik pada sel penerima, yang setara dengan efek terapeutik MSCs.¹⁴ Mekanisme yang mendasari aktivitas *Exosome-MSCs* terhadap hiperpigmentasi hingga saat ini masih belum jelas, sehingga perlu dilakukan penelitian.

Kasus hiperpigmentasi di Indonesia mencapai 0.25-4% dari seluruh kasus penyakit kulit.¹⁵ Paparan UV-B mengakibatkan 8% kasus karsinoma skuamosa yang dikenal dengan kanker kulit melanoma

dengan potensi metastasis tinggi.¹⁶ Kejadian hiperpigmentasi meningkat pada tahun 2020 dengan 100-350 kasus baru dan 6.850 kasus kematian akibat perkembangan menjadi kanker kulit.¹⁷ Gangguan hiperpigmentasi diobati dengan berbagai agen pencerah kulit, namun pengobatan ini tidak sepenuhnya memberantas lesi kulit. Dengan demikian, ada kebutuhan yang meningkat untuk mengembangkan pilihan pengobatan alternatif yang lebih spesifik dan efektif.¹⁸ Bahan pencerah kulit banyak ditemukan dalam bahan kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi, diantaranya adalah Asam Askorbat, Arbutin, Asam Kojik, dan Hidrokuinon. Lebih dari 50 tahun krim hidrokuinon 4% sudah menjadi standar baku untuk pengobatan hiperpigmentasi. Hidrokuinon memiliki efek dermatitis alergi atau iritan dan okronosis. Oleh karena itu penggunaan hidrokuinon saat ini sudah mulai sangat dibatasi.¹⁹

Exosome MSCs mengandung berbagai komponen yang disekresikan oleh MSCs berupa sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan yang terdiri dari IL-10, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platet Derived Growth Factor* (PDGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), dan TGF- β .^{20,21} Molekul soluble yang disekresikan MSCs termasuk IL-10 dan TGF- β mengendalikan kerusakan kulit akibat radiasi sinar UV-B dengan merangsang fibroblast menghasilkan *collagen*.^{22,23} Menghambat dalam pembentukan melanin dan meredam inflamasi.²⁴ Hasil penelitian melaporkan bahwa paparan sinar UV-B yang menyebabkan hiperpigmentasi diatur oleh gen, protein dan enzim, yaitu *Tyrosinase*,

MITF , TRP-1 dan TRP-22.^{25,26,27} Sinar UV-B memicu *Tyrosinase* yang bertanggung jawab dalam *Hidroksilasi L-Tyrosine* menjadi *L-3, 4-dihydroxyphenylalanine* (L-DOPA). L-DOPA selanjutnya dioksidasi menjadi L-DOPA kuinon untuk dibentuk menjadi eumelanin dan pheomelanin dalam jalur produksi melanin.¹⁴ *Exosome MSCs* adalah vesikel lipid bilayer berbentuk bola dengan diameter terdistribusi berkisar antara 30-150 nm.¹⁶ Memiliki efisiensi penetrasi kulit yang tinggi, mirip dengan nanopartikel liposom.^{28,29} Hal ini memungkinkan pemberian *Exosome* secara injeksi sub cutan , membuat area luka lebih mudah menerima *Exosome* terapeutik .³⁰ Selain itu, *Exosome* yang dikirimkan juga dapat bersifat kemotaktik pada lokasi Inflamasi atau cedera ketika terdapat jarak antara area yang diberikan dan pusat lesi.³¹ Beragam molekul bioaktif pada *Exosome* dapat memberikan manfaat kuratif melalui banyak mekanisme terapi yang berbeda secara bersamaan , sehingga menghasilkan efek biologis yang lebih baik dibandingkan senyawa molekul kecil.¹⁴ *Exosome* yang dilepaskan dapat mencapai sel targetnya melalui cara parakrin atau melalui sirkulasi dan kemudian diinternalisasi oleh sel penerima dengan cara interaksi ligan - reseptor , endositosis yang dimediasi molekul permukaan, mikropinositosis , atau fagositosis; atau fusi membran plasma dengan sel penerima. Setelah pelepasan isi *Exosome* yang tertutup di sitoplasma penerima , perubahan jalur sinyal intraseluler terjadi pada sel penerima untuk memodulasi proses dan fungsi seluler.³² Dengan demikian

menunjukkan bahwa *Exosome MSCs* yang mengandung komponen spesifik MSCs untuk memberikan efek spesifik pada sel penerima, yang setara dengan efek terapeutik MSCs.¹⁴

Pada penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *Exosome* yang bersumber dari MSCs dapat mempercepat proses perbaikan kulit terutama pada kasus penyembuhan luka, penuaan dan hiperpigmentasi.^{38,39,40,41,42} Sumber MSCs paling banyak digunakan berasal dari sel adiposa dan tali pusat bayi^{38,39,40,41,42}. *Exosome MSCs* diberikan baik dengan cara topikal, injeksi intra lesi dan intravena.^{38,39,40,41,42} Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan dengan dosis injeksi *Exosome* yang diisolasi dari umbilical cord blood dengan dosis 20 μ L menstimulasi penutupan luka dengan menginduksi produksi *collagen* melalui jalur TGF- β 1 dapat melakukan perannya dalam perbaikan kulit sebagai anti inflamasi dengan cara polarisasi makrofag M1 menjadi makrofag M2.^{40,42} Makrofag M2 mengekspresikan kadar IL-10 yang lebih tinggi disertai *Growth Factor* seperti PDGF, VEGF dan TGF β .^{40,42} Penelitian sebelumnya berbeda dengan penelitian ini karena *Exosome* diberikan pada kasus kulit hiperpigmentasi serta *Exosome* yang digunakan berasal dari MSC tali pusat yang dikondisikan dalam keadaan *Hypoxia*. Pemberian *Exosome* pada penelitian ini dilakukan melalui injeksi pada kulit. Penerapan secara injeksi *sub cutan* menggunakan *Exosome-MSCs* dengan penetrasi kulit yang tinggi dan ukuran molekulnya yang kecil sangat mudah untuk diabsorpsi menembus barrier kulit menuju dermis.^{14,28,29} Oleh karena itu, adanya potensi

Exosome MSCs sebagai alternatif untuk mencegah hiperpigmentasi pada kulit. Maka penelitian ini akan melakukan pengamatan secara *in vivo* terhadap ekspresi FGF dan TRP pada kulit Mencit C57BL Jantan model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan dalam mengkaji peran *Exosome MSCs* pada hiperpigmentasi akibat paparan UV-B pada ekspresi gen FGF dan TRP.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat dirumuskan adalah “Apakah terdapat pengaruh pemberian *Exosome Mesenchymal Stem Cells* (E-MSCs) hypoxia terhadap ekspresi gen FGF dan TRP pada Mencit C57BL jantan model hiperpigmentasi dipapar sinar UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12 ? “

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian *Exosome Mesenchymal Stem Cells* (E-MSCs) hypoxia terhadap ekspresi gen FGF dan TRP pada Mencit C57BL jantan model hiperpigmentasi dipapar sinar UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain untuk :

- a. Mengetahui ekspresi gen FGF pada Mencit C57BL jantan model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B setelah diberi E-MSCs secara injeksi *sub cutan* dengan dosis 200µl dan 300µl dibandingkan kontrol secara *in vivo*.
- b. Mengetahui ekspresi gen TRP pada Mencit C57BL jantan model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B setelah diberi E-MSCs secara injeksi *sub cutan* dengan dosis 200µl dan 300µl dibandingkan kontrol secara *in vivo*.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teori adalah memberikan ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian E-MSCs hypoxia terhadap ekspresi gen FGF dan TRP pada Mencit C57BL jantan model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12 .

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah :

1. Memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh E-MSCs hypoxia terhadap ekspresi gen FGF dan TRP

pada Mencit C57BL jantan *hiperpigmentasi* yang dipapar sinar UV-B.

2. Penelitian lebih lanjut diharapkan dapat diaplikasikan bagi masyarakat.



1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Yan Zhang <i>et al</i> , 2021 ³³	Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor- β receptor inhibition	<i>In vivo</i> , eksperimen	Eksosome yang diisolasi dari umbilical cord blood menstimulasi penutupan luka dengan menginduksi produksi kolagen melalui jalur TGF-B pada dosis 20 μ L.
2	Shiqi Hu <i>et al</i> , 2019 ³⁴	Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging	<i>In vivo</i> , eksperimen	Eksosome menyebabkan peningkatan ekspresi prokolagen tipe I dan penurunan ekspresi MMP-1 yang signifikan, terutama melalui penurunan regulasi tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) dan peningkatan regulasi transforming growth factor beta (TGF- β).
3	Yi You <i>et al</i> , 2023 ³⁵	Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy	<i>In vivo</i> , eksperimen	Pemberian eksosom MSCs meningkatkan produksi collagen A1, dan mencegah degradasi ekstra seluler matriks
4	Jing Li <i>et al</i> , 2022 ³⁶	Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit production of extracellular matrix in keloid fibroblasts via downregulating transforming growth factor- β 2 and Notch-1 expression	<i>In vivo</i> , eksperimen	Eksosome dari human adipose-MSCs menghambat produksi ekstraseluler matriks melalui downregulasi TGF-B2 dan Notch-1
5	Raluca Tutuian <i>et al</i> , 2021 ³⁷	Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Promote In Vitro Wound Healing by Modulating the Biological Properties of Skin Keratinocytes and Fibroblasts and Stimulating Angiogenesis	<i>In vitro</i> , eksperimen	Eksosome human MSCs menghambat degradasi kolagen melalui penghambatan ekspresi kolagen tipe 1 dan III, serta menghambat ekspresi α -SMA, MMP2, dan MMP13, dan MMP14

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
6	Park GH <i>et al</i> , 2023 ³⁸	Efficacy of combined treatment with human adipose tissue stemcell-derived exosome-containing solution and microneedling for facial skin aging:A 12week prospective ,randomized,split- face study	<i>In vivo</i> , eksperi mental	Kombinasi microneedling dengan adipose tissue stem cell-derived eksosome menunjukkan efek anti-inflamasi dan anti penuaan pada subjek berusia 40 tahun keatas dengan menekan radikal bebas, menekan produksi molekul inflamasi dan meningkatkan produksi kolagen yang ditandai dengan berkurangnya kerutan dan memudarnya flek hitam pada wajah
7	Byong Seung Cho <i>et al</i> , 2020 ³⁹	Skin Brightening Efficacy of Exosomes Derived from Human Adipos Tissue-Derived Stem/Stromal Cells: A Prospective, Split-Face, Randomized Placebo-Controlled Study	<i>In vivo</i> , eksperi mental	Adipose stem cell-exosome meningkatkan sintesis seramid, dihidroseramida, sfingosin, dan sfingosin 1- fosfat (S1P) pada kulit tikus dengan defek barrier yang diinduksi oksazolone.
8	He X <i>et al</i> , 2019 ⁴⁰	MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing.	<i>In vivo</i> , eksperi mental	MSC-derived exosome mendorong polarisasi makrofag M2 pada luka. Ekspresi faktor spesifik M2, seperti RELM- α dan Arginase juga menunjukkan peningkatan pada luka. Makrofag mengekspresikan kadar IL-10 yang lebih tinggi dan kadar TNF- α yang lebih rendah setelah pemberian MSC-derived eksosome.
9	MaryamA <i>et al</i> , 2021 ⁴¹	Umbilical cord as a source of mesenchymal stem cells improves melasma in parturients: aclinical randomized trial	<i>In vivo</i> , eksperi mental	Tali pusat segar, sebagai masker wajah alami yang mengandung MSC, dapat memberikan perbaikan pada lesi hiperpigmentasi melasma secara klinis.

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
10	Zhu Z <i>et al</i> , 2022 ⁴²	Exosomes Derived From Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Treat Cutaneous Nerve Damage and Promote Wound Healing.Fibroblasts and Stimulating Angiogenesis	<i>In vivo</i> , experi mental	Umbilical cord mesenchymal stemcell eksosome memberikan penyembuhan kulit yang lebih cepat dibandingkan dengan kelompok control pada mencit karena mengandung banyak factor pertumbuhan

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *Exosome* yang telah diisolasi dari *umbilical cord blood* menstimulasi penutupan luka dengan menginduksi *collagen* melalui jalur TGF- β pada dosis 20.³³ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana E-MSCs akan ditreatment pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UV-B dan dianalisis ekspresi gen FGF dan TRP. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa *Exosome* menyebabkan peningkatan ekspresi *procollagen type I* dan penurunan ekspresi MMP-1 yang signifikan, terutama melalui penurunan regulasi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan peningkatan regulasi *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β).³⁴ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana E-MSCs akan ditreatment pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UV-B dan dianalisis ekspresi gen FGF dan TRP. Penelitian terdahulu menemukan bahwa pemberian *Exosome* MSCs meningkatkan produksi *collagen A1*, dan mencegah degradasi ekstra seluler matriks.³⁵ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa *Exosome* dari *human adipose-MSCs* menghambat produksi ekstraseluler matriks melalui *down regulasi* TGF-B2 dan Notch-1³⁶. Penelitian tersebut berbeda dengan

penelitian ini dimana E-MSCs akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UV-B dan dianalisis ekspresi gen FGF dan TRP. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *Exosome Human MSCs* menghambat degradasi *collagen* melalui penghambatan ekspresi *collagen type 1 dan III*, serta menghambat ekspresi α -SMA, MMP2, dan MMP13, dan MMP14.³⁷ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana E-MSCs akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UV-B dan dianalisis ekspresi gen FGF dan TRP.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fibroblast Growth Factor (FGF)

FGF adalah keluarga protein pemberi sinyal sel yang diproduksi oleh berbagai jenis sel. Anggota pertama dari keluarga faktor pertumbuhan fibroblast (FGF) (FGF1 dan FGF2) ditemukan pada tahun 1970-an dan awalnya diberi nama FGF asam dan basa, masing-masing ⁴³. FGF dapat memengaruhi proliferasi banyak sel, termasuk sel endotel, neuron, kondrosit, sel otot polos, melanosit, dan adiposit ⁴⁴. Mereka terlibat dalam berbagai proses biologis, termasuk proliferasi seluler, kelangsungan hidup, metabolisme, morfogenesis, diferensiasi, perkembangan embrio, angiogenesis, perbaikan jaringan, dan regenerasi ⁴⁵. FGF memicu pensinyalan dengan berinteraksi dengan reseptor tirosin kinase, yang dikenal sebagai Reseptor FGF (FGFR). Keluarga reseptor tirosin kinase FGFR, ditemukan pada tahun 1970-an, terdiri dari empat reseptor transmembran: FGFR1–4 ⁴⁶. Masing-masing mengandung tiga domain pengikat imunoglobulin ekstraseluler, diikuti oleh domain transmembran dan domain intraseluler yang merupakan tirosin kinase dua bagian ⁴⁷. Untuk transduksi sinyal oleh sebagian besar FGF, pengikatannya ke koreseptor, baik protein Klotho atau proteoglikan *Heparan Sulfat* (HS), pada permukaan sel target juga diperlukan ⁴⁸.

Saat ini, 22 FGF (yaitu, ligan) diketahui, yang 18 berinteraksi dengan dan menginduksi dimerisasi FGFR. Setelah stimulasi, reseptor ini mengaktifkan kaskade pensinyalan hilir melalui domain intraselulernya. Dengan tidak adanya ligan, konfigurasi tidak aktif dari kinase FGFR dihambat secara alosterik oleh daerah engsel dan loop aktivasinya. Dengan adanya ligan ekstraseluler, FGFR dimerisasi dan autofosforilasi. Dengan demikian, ia meluncurkan beberapa jalur pensinyalan, misalnya, kaskade fosfolipase C γ (PLC γ), PI3K-AKT, dan RAS-MAPK ⁴⁹. FGF diekspresikan dalam berbagai jaringan dan menunjukkan ekspresi diferensial menurut kebutuhan metabolik. Beberapa isoform FGF dan FGFR ada karena penyambungan alternatif dan situs inisiasi translasi alternatif. Ekspresi FGF juga diatur pada tingkat epigenetik dan pasca-translasi, termasuk fosforilasi, glikosilasi, ubiquitinasi, dan pergerakan seluler ⁵⁰. Gangguan pada sinyal FGF berkontribusi terhadap banyak penyakit, termasuk berbagai jenis kanker, cacat pada sistem rangka, penyakit perkembangan, kondrodysplasia, neovaskularisasi kornea, dan rakhitis hipofosfatemia terkait kromosom X ⁵¹, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. FGF21 telah diusulkan menjadi biomarker potensial untuk penyakit mitokondria ⁵². Aktivitas abnormal dari berbagai jenis FGF dapat mengakibatkan gangguan ^{53,54}. FGF23 diekspresikan pada tingkat tinggi dalam sel-sel tulang, khususnya pada osteoklas. Ekspresi FGF23 telah ditemukan meningkat pada kelainan tulang dan penyakit ginjal kronis juga ^{55,56,57,58}. Fibroblas terkait kanker adalah fibroblas aktif yang berfungsi sebagai komponen kunci dari lingkungan

mikro tumor ⁵⁹. Mereka memicu jalur MEK–*Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) dan memodulasi MMP7 melalui FGFR4 untuk merangsang pertumbuhan sel kanker dan angiogenesis ⁶⁰. Selain itu, FGF dihipotesiskan berkontribusi pada pengembangan resistensi kemoterapi pada sel kanker ⁶¹. Oleh karena itu, jelas bahwa aktivitas FGF yang abnormal dapat menyebabkan beberapa kanker karena ekspresi ligan atau reseptor yang berlebihan atau mutasi somatik pada gen FGFR.

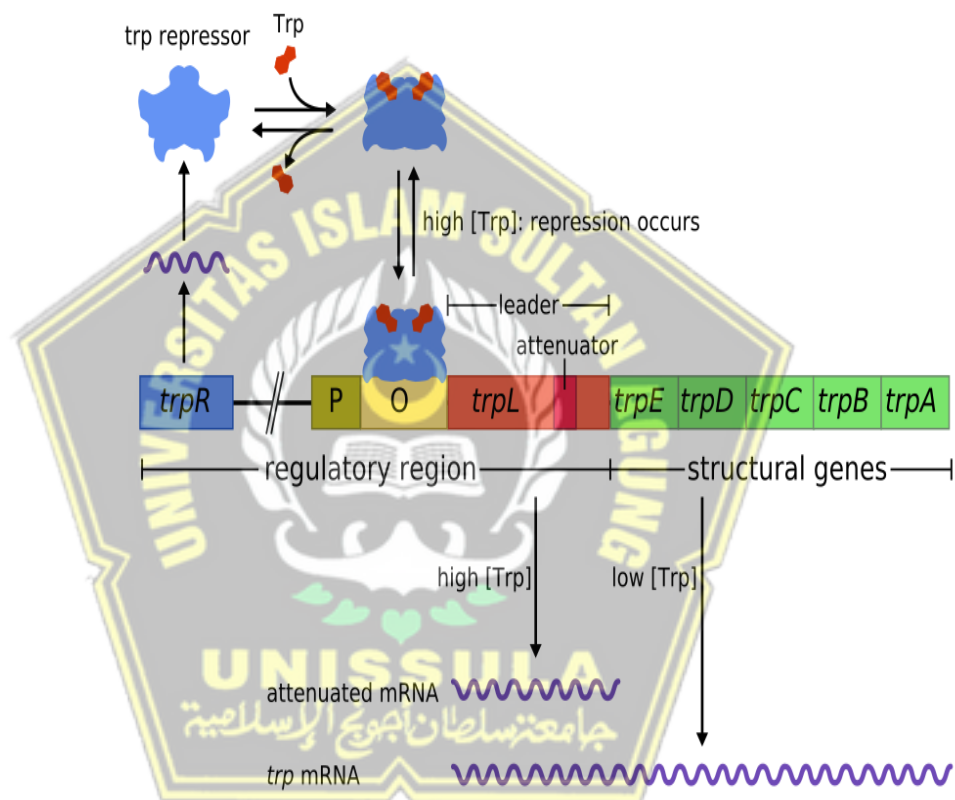


Gambar 2.1. Peran FGF dalam proses perbaikan jaringan. ⁶²

2.2. Transient Receptor Potential (TRP)

Transient Receptor Potential (TRP) adalah saluran ion (permeabel Ca^{2+}) yang bertindak sebagai sensor seluler karena terlibat dalam pendeteksian suhu (panas dan dingin), rangsangan kimia dan mekanik⁶³. Pada mamalia, 28 gen saluran TRP yang berbeda telah diidentifikasi, dibagi menjadi enam subfamili berdasarkan homologi sekuens: TRPA, TRPV, TRPC, TRPM, TRPP dan TRPML⁶⁴. Karena ekspresi dan fungsi saluran TRP dapat diatur oleh hormon dan faktor pertumbuhan yang ada di endometrium, mereka adalah kandidat yang sangat baik untuk menerjemahkan dan mengkodekan pesan dari lingkungan mikro endometrium menjadi respons seluler⁶⁵. Menariknya, laporan sebelumnya telah mengidentifikasi pola ekspresi mRNA yang sangat berbeda dari saluran TRP di ESC dan EEC^{66,67,68}. Tanda tangan saluran TRP yang berbeda ini menunjukkan perbedaan dalam sensitivitas dan respons ESC dan EEC terhadap lingkungan ekstraseluler. Dengan demikian, ekspresi mRNA tinggi dari TRPV2 dan TRPC1 diamati dalam ESC sedangkan ekspresi mRNA tinggi dari TRPM4 mencirikan EEC. Sinyal kalsium spasiotemporal divergen yang ditimbulkan oleh aktivasi saluran TRP spesifik fenotipe ini mungkin terlibat dalam regulasi proses tertentu yang terkait dengan fenotipe sel atau memfasilitasi transisi fenotipik. Oleh karena itu, perubahan dalam pola ekspresi saluran TRP ini dapat memiliki efek besar pada perilakunya, mungkin memfasilitasi perilaku ganas.

Tinjauan umum tentang pengetahuan terkini tentang ekspresi dan aktivitas saluran TRP dalam fenotipe seluler dan EMT disediakan di tempat lain ⁶⁹. Sejalan dengan ini, modifikasi dalam ekspresi saluran TRP telah diamati dalam beberapa jenis kanker seperti kanker prostat, kanker payudara, dan kanker usus besar ^{70,71,72}.



Gambar 2.2. Struktur Operon TRP ⁷³

2.3. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)

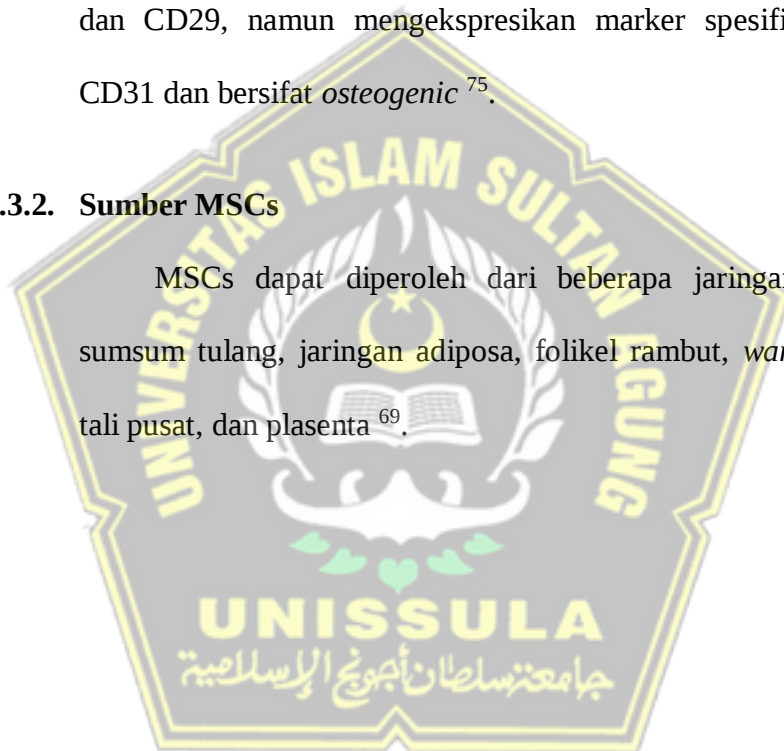
2.3.1. Definisi MSCs

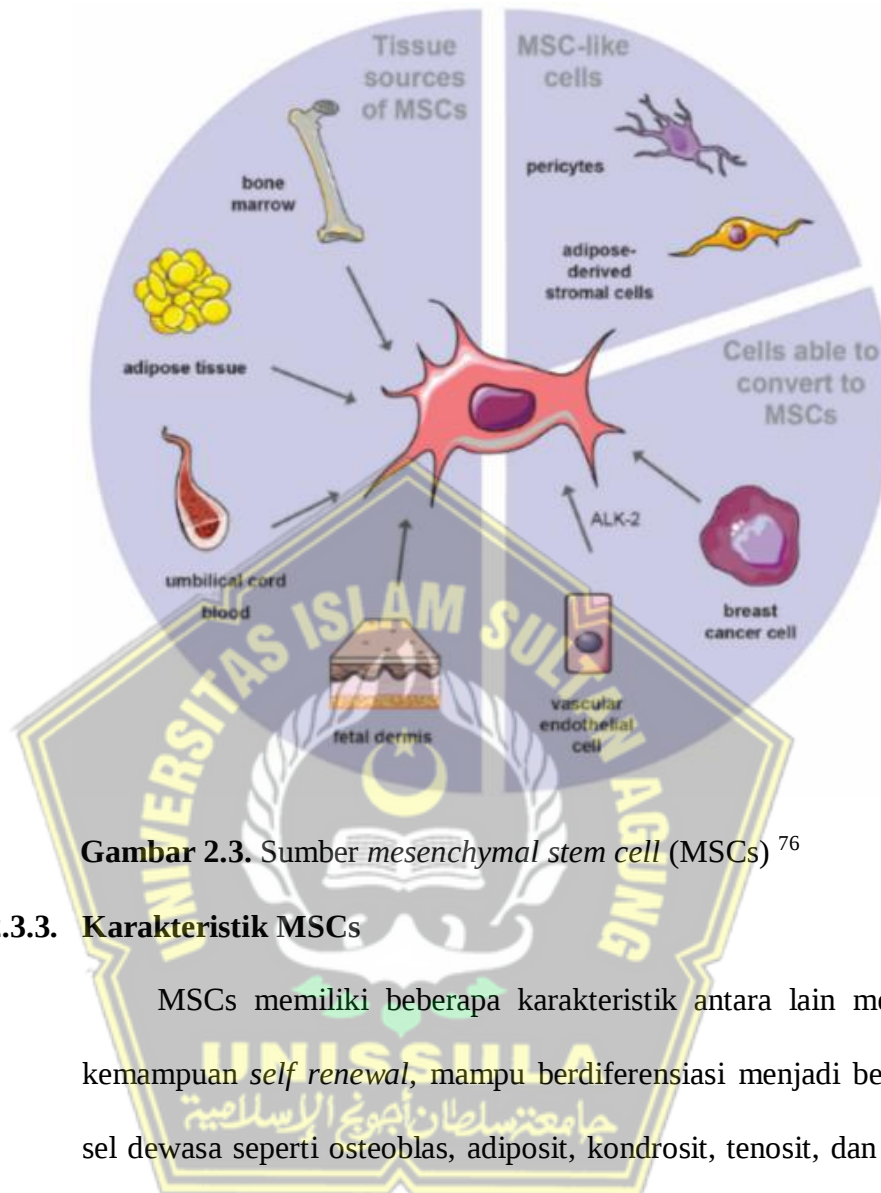
Mesenchymal Stem Cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adipositi, dan neurosit. Mesenchymal stem cell

dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat ⁷⁴. Secara umum MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel *fibroblast* atau jarum. Secara *fenotype* MSCs yang diisolasi dari tikus, dimana MSCs tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat *osteogenic* ⁷⁵.

2.3.2. Sumber MSCs

MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta ⁶⁹.

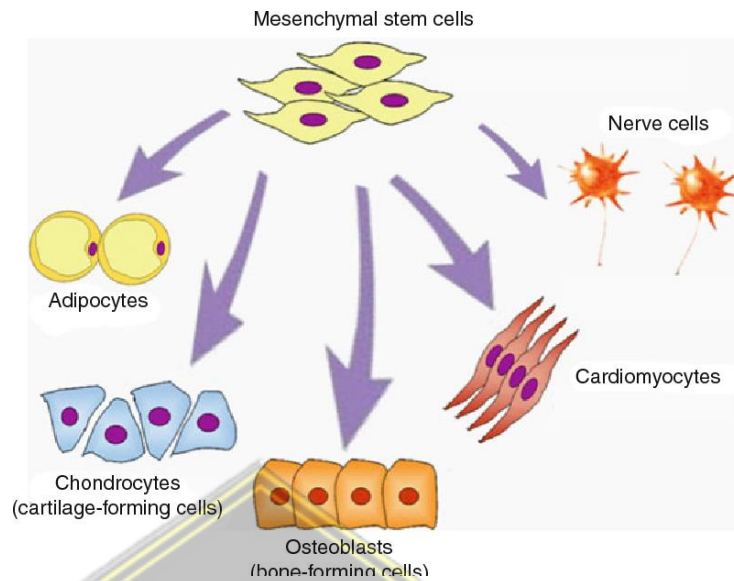




Gambar 2.3. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs) ⁷⁶

2.3.3. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit ⁷⁷. Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekskresi beberapa sitokin baik pro maupun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit ⁷⁸.



Gambar 2.4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁷⁹

2.3.4. Peran MSCs

Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk berubah menjadi MSCs tipe 1 yang bersifat pro-inflamasi atau menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi. MSCs tipe 1 berperan dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Hal ini menyebabkan proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi

selesai, MSCs akan berubah peran menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengekspresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi^{80,81}.

2.4. *Exosome* MSCs

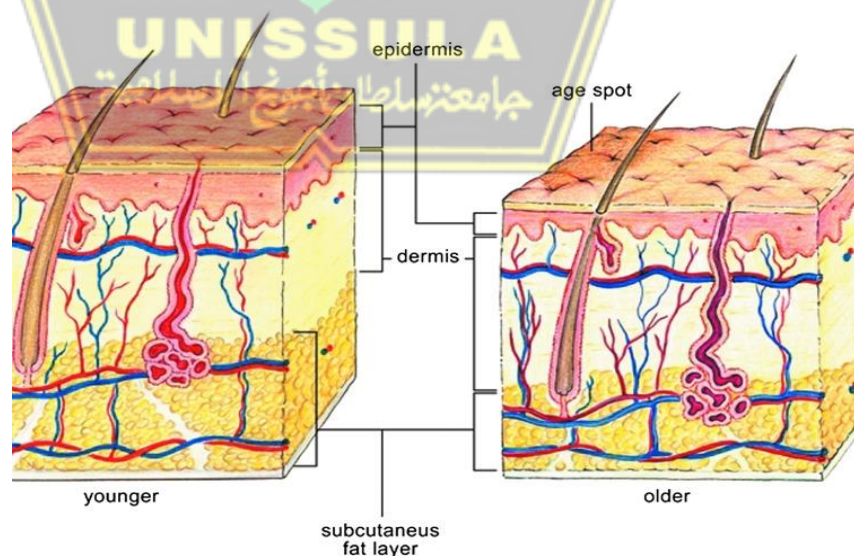
MSCs diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, IL, *Growth Factor* (GF), hormon, exosome, mikrovesikel, faktor anti inflamasi dll^{82,83}. Faktor-faktor ini dianggap sebagai protagonis untuk berpartisipasi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan melalui parakrin yang memediasi pensinyalan sel ke sel. Dalam hal regenerasi kulit, salah satu sitokin yang bertanggung jawab yaitu TGFβ^{84,85}. TGFβ memiliki peran kunci dalam regulator sintesis *procollagen I*⁸⁶. Lebih lanjut TGFβ menginduksi penundaan aktivasi ERK signaling pathway^{87,88}. Disisi lain TGFβ menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan MMP tidak aktif sehingga tidak ada degradasi *collagen*⁸⁹. Kandungan IL-10 yang tinggi pada *Exosome* dapat menghambat produksi ROS sehingga menurunkan inflamasi⁹⁰.

2.5. *Collagen*

2.5.1. Definisi

Collagen merupakan protein (polipeptida) ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ

tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe *collagen* jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia ⁹⁰. *Collagen-1* merupakan jenis serabut *collagen* terbanyak yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit. Serabut *Collagen-1* berperan penting dalam pembentukan jaringan parut. *Collagen-2*, *Collagen-9*, *Collagen-10*, *Collagen-11* ditemukan pada kartilago. *Collagen-3* banyak dijumpai pada ; kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. *Collagen-3* penyebarannya hampir sama dengan *Collagen-1*. Sedangkan *Collagen-7* kebanyakan lokasinya terletak pada *anchoring fibril* di *dermal ,epidermal junction* pada kulit, mukosa dan servik. *Collagen-7* juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah ⁹¹.



Gambar 2.5. Perbedaan *Collagen* Pada Kulit Muda dan Kulit Tua ⁹².

Telah banyak dibuktikan bahwa tipe *collagen* yang mendominasi organ kulit adalah *Collagen-1* dan *Collagen-3* yang berfungsi pada pertahanan mekanik. Akan tetapi tipe *collagen* lain yang juga ada pada kulit seperti ; *Collagen-5*, *Collagen-6*, *Collagen-7*, *Collagen-12* ditemukan dalam jumlah minimal yang diperkirakan ikut menunjang, akan tetapi peran yang pasti belum jelas ⁹⁰. Karena *Collagen-1* yang mendominasi organ kulit, maka *Collagen-1* yang akan diukur pada penelitian kali ini.

Pada umumnya jumlah *collagen* akan berkurang dengan bertambah umur. Akan tetapi beberapa tipe *collagen* mengalami hal yang tidak sama. Pada kulit anak mempunyai banyak *Collagen-3* (biasanya pada jaringan dengan pertumbuhan cepat). Pada proses penuaan intrinsik akan terjadi penurunan *Collagen-3* dan peningkatan *Collagen-1*. *Collagen-1* terus meningkat sampai umur 35 tahun, saat kulit mencapai puncak kekuatan mekanik, setelah itu *Collagen-1* akan menurun. Hubungan umur dengan jumlah *collagen* sampai saat ini belum jelas, akan tetapi jumlah *collagen* manusia setelah umur 60 tahun secara keseluruhan secara signifikan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kulit umur lebih muda ⁹¹.

Collagen merupakan serat utama pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein yang berfungsi untuk kekuatan mekanik dan

penyangga kulit. Semakin bertambah umur maka struktur protein kulit dan komponen kulit lain akan berubah dan hal ini menyebabkan penuaan kulit. Perubahan jumlah *collagen* merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Diperkirakan bahwa akan terjadi penurunan *collagen* sekitar 1% pertahun perunit area kulit akan tetapi pada kulit yang terpapar sinar UV-B dijumpai penurunan sampai 59% seperti yang ditemukan pada kulit yang mengalami *photodamage*⁹⁰.

Walaupun *Collagen-1* merupakan kolagen utama pada lapisan dermis kulit akan tetapi *collagen* tipe lain juga tidak kalah peranan pentingnya. *Collagen-7* yang terbanyak pada *anchoring fibril* terletak pada membrana basalis yang melekatkan membrana basalis ke papila dermis. Pada pasien dengan paparan sinar UV-B kronis akan menurunkan jumlah *Collagen-7* dan akan mengakibatkan perlekatan antara membrana basalis dengan papilla dermis menurun sehingga ikatan epidermis dan dermis menjadi lemah. Pada satu penelitian didapatkan bahwa kerutan kulit terbentuk akibat lemahnya ikatan antara dermis dan epidermis oleh karena degenerasi *anchoring fibril*. Hal ini ditambah adanya bukti adanya penurunan *Collagen-7* pada dasar kerutan kulit di samping juga ditemukan penurunan *Collagen-4* pada tempat yang sama⁹³

2.5.2. Perubahan pada *collagen*

Pada kulit yang mengalami *Photoaging*, serat *collagen* mengalami disorganisasi. Serabut *collagen* dan kumpulan serat *collagen* berkurang serta mengalami homogenisasi. Kulit yang mengalami *Photoaging* prekursor *Collagen Type I* dan *III* dan *crosslink*-nya berkurang⁹⁴. Dengan menggunakan *antibody* terhadap *Collagen Type I*, tidak ditemukan ada perubahan *collagen* setelah radiasi UVB-B selama 10 minggu. Peningkatan *Collagen Type III* dimulai setelah terpapar UVB-B selama 12 minggu (5 hari per minggu dengan ½ MED setiap pemaparan).

Collagen dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik meliputi sinar *ultraviolet*, polusi, dan diet. Faktor ekstrinsik dapat memperberat kerusakan *collagen* yang disebabkan oleh faktor intrinsik. Pengaruh faktor genetika tampak pada studi penuaan kulit pada berbagai etnis. Etnis dengan pigmentasi lebih gelap, seperti ras Afrika-Amerika, memiliki daya perlindungan yang lebih tinggi terhadap *Ultraviolet*. *Ultraviolet* memicu pembentukan radikal bebas sehingga merusak *collagen* kulit. Kulit ras Afrika - Amerika mengandung lipid interseluler lebih banyak daripada ras Kaukasia sehingga lebih resisten terhadap penuaan. Kerutan wajah pada ras Asia terjadi lebih lambat dan lebih ringan daripada ras Kaukasia⁹².

Penurunan *collagen* kulit tampak signifikan pada wanita *menopause*. *Collagen* kulit orang dewasa berkurang 1 % setiap tahun.

Penurunan *collagen* ini lebih tampak pada wanita daripada pria. Kulit kendur dan kerutan wajah disebabkan kerusakan akumulasi *collagen*. *Ultraviolet* juga memicu pembentukan radikal bebas, yang dapat bereaksi dengan protein *collagen* sehingga terjadi kerusakan *collagen* ⁹⁵.

2.5.3. Mekanisme kerusakan *collagen*

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur *fibroblast* yang menunjukkan bahwa paparan pada kultur *fibroblast* kulit yang mengalami kerusakan akibat *ultraviolet*. Pada kulit yang terlindungi sinar matahari dengan *Collagen Type I* yang terdegradasi sebagian diperoleh melalui percobaan *in-vitro collagen* yang dicampur dengan MMPs yang diinduksi oleh sinar *ultraviolet*, yang terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu; mekanisme secara langsung terjadi degradasi *collagen* secara tidak langsung melalui hambatan sintesis *collagen* oleh degradasi *collagen* yang terbentuk dari MMP. *Colagen Type I* yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya ⁹⁶. Model yang menggambarkan kerusakan akibat paparan sinar UV-B pada jaringan kulit. Paparan *ultraviolet* mengaktifkan faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin pada permukaan *keratinosite* dan *fibroblast*. Reseptor aktif menstimulasi jalur sinyal transduksi dan merangsang faktor transkripsi AP-1, yang mempengaruhi transkripsi gen MMP. Dalam

fibroblast, AP-1 juga menghambat ekspresi gen *procollagen*. MMP disekresikan oleh *keratinocyte* dan *fibroblast* dan memecah *collagen* dan protein lain yang terdapat pada matriks ekstraseluler dermis. Perbaikan kerusakan kulit yang tidak sempurna dapat mengganggu integritas fungsional dan struktural dari matriks ekstraseluler. Paparan sinar matahari berulang menyebabkan akumulasi kerusakan *collagen* yang akhirnya menghasilkan kerutan yang spesifik (*photodamage skin*)^{97,98}.

2.5.4. Sintesis *Collagen*

Awal polipeptida dibentuk di dalam ribosom dari retikulum endoplasma kasar yang disebut rantai *procollagen α*, dimana terjalin dalam sistena retikulum endoplasma sehingga terbentuk *triple helices*. Setiap asam amino ketiga pada rantai α disebut sebagai glisin; dua asam amino kecil lainnya terbanyak di dalam *collagen* dihidroksilasi setelah proses translasi menjadi bentuk hidroksiprolin dan hidroksilisin⁹⁹.

2.5.5. Sintesis *Procollagen*

Bentuk *triple helix* dari rantai α berbentuk molekul *procollagen* seperti sebuah batang, dimana *Collagen Type I* dan *II* berukuran panjang, 300nm dan lebar 1,5nm. Molekul *procollagen* mungkin homotrimerik, dimana ketiga rantainya identik, atau heterotrimerik, dimana dua atau ketiga rantainya memiliki sekuen yang berbeda.

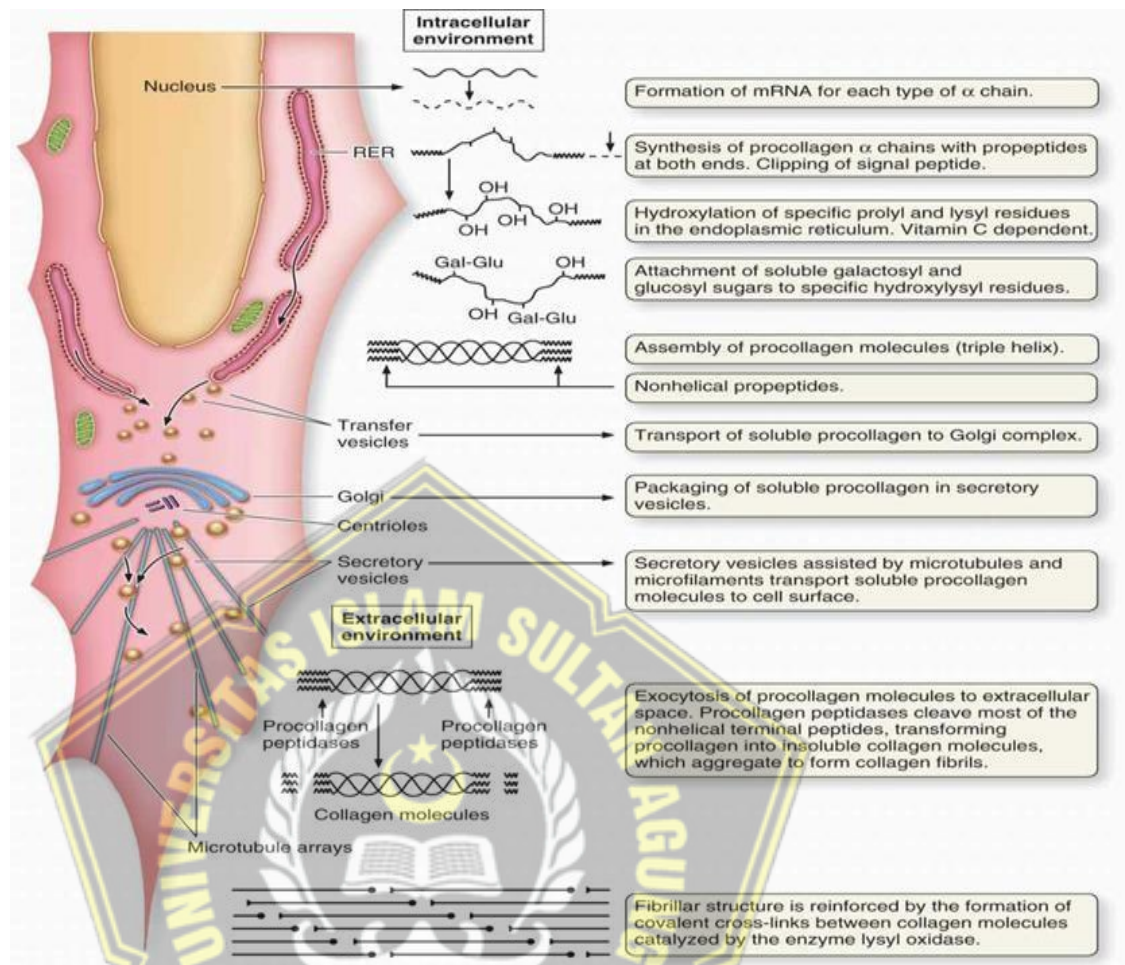
Kombinasi dari banyak rantai *procollagen* α sangat bertanggungjawab atas bermacam-macam tipe dari *collagen* dengan struktur dan fungsi yang berbeda. Pada *Collagen Type I, II, III*, molekul *collagen* bersatu dan menjadi berkelompok bersama-sama membentuk fibril¹⁰⁰.

Karena *Collagen Type I* sangat banyak, maka didapatkan banyak penelitian tentang sintesis *collagen* ini. Sintesis ini meliputi beberapa tingkat, dimana disimpulkan pada **gambar 2.6**¹⁰¹:

1. Lipetida rantai *procollagen* α diproduksi pada ikatan *polyribosome* yang berikatan dengan membran dari *Reticulum Endoplasma* yang kasar dan ditranslokasi di dalam sisterna dan dilanjutkan dengan sinyal peptide.
2. Hidroksilasi prolin dan lisin diawali sesudah rantai peptide telah mencapai panjang minimum tertentu dan masih terikat pada *ribosome*. Enzim yang menyertai adalah *prolil hidroksilase* dan *lisil hidroksilase* dan reaksi yang membutuhkan O_2 , Fe^{2+} dan asam askorbat (vitamin C) sebagai *Cofactor*.
3. Terjadi glikosilasi pada beberapa sisa hidroksilisin, dengan bermacam-macam tipe dari *collagen* yang memiliki jumlah ikatan *galaktosa-hidroksilisin* yang berbeda-beda.
4. Gugus amino dan karboksil akhir dari setiap rantai α membentuk polipeptida non helix, kadang disebut propeptida ekstensi, dimana membantu rantai α (α_1 , α_2) membentuk

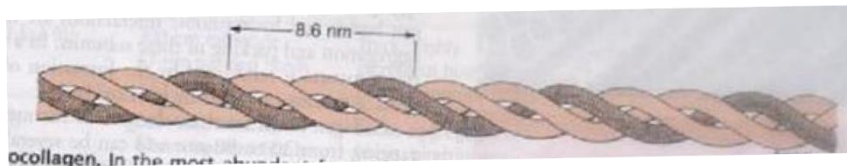
dengan posisi yang benar menjadi *triplehelix*. Sebagai tambahan, *propeptida nonhelix* membuat molekul *procollagen* soluble dan mencegah pembentukan intraseluler prematur dan pengendapan dari fibril *collagen*. *Procollagen* ditranspotasikan melalui jaringan golgi dan dieksositosis ke lingkungan ekstraselular.

5. Diluar sel, protease spesifik disebut *peptidase procollagen* menyingkirkan perpanjangan *propeptida*, perubahan dari molekul *procollagen* menjadi molekul *collagen*. Sekarang ini sesuai untuk pembentukan sendiri kedalam *fibril collagen polimerik*, biasanya pada tempat tertentu dekat dengan permukaan sel.
6. Pada beberapa tipe *collagen*, *fibril* berkumpul membentuk *fiber*. Proteoglikan tertentu dan tipe *collagen* (tipe V dan tipe XI) bergabung pada kumpulan molekul *collagen* untuk membentuk *fibril-fibril* dan formasi *fiber* yang berasal dari *fibril* dan berikatan dengan struktur dari komponen-komponen ekstraselular matrik lainnya.
7. Struktur fibriler ditarik oleh formasi kovalen yang berikatan silang antara molekul-molekul *collagen*, sebuah proses dikatalisis oleh enzim *lisil oksidase*.



Gambar 2.6. Sintesis Collagen ¹⁰²

Proses Hidrosilasi dan glikosilasi pada rantai α procollagen dan pembentukan menjadi *triple helices* terjadi pada RER (*Rough Endoplasmic Reticulum*) dan pembentukan menjadi fibril terjadi pada *Extracellular Matrix* sesudah mengekskresikan *procollagen*. Karena ada sedikit perbedaan pada gen rantai α procollagen dan produksi collagen tergantung pada beberapa kejadian setelah translasi meliputi beberapa enzim lainnya, banyaknya penyakit kegagalan sintesa collagen yang telah dijelaskan ¹⁰⁴.



Gambar 2.7. Procollagen ¹⁰³

Bentuk dari *collagen* yang paling banyak, tipe 1, setiap molekul *procollagen* terdiri dari dua rantai peptide yaitu $\alpha 1$ dan $\alpha 2$. Massa 1 buah molekular kira-kira 100 kDa, terjalin *helix* pada sisi kanan dan bergabung bersama oleh interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik. Setiap putaran lengkap dari pilinan *helix*, dengan jarak 8,6 nm. Panjang setiap molekul *procollagen* adalah 300 nm dan lebarnya 1,5 nm ¹⁰³.

2.6 Paparan Sinar UV-B terhadap Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi adalah keadaan akumulasi melanin yang berlebih pada bagian kulit ^{100,101}. Melanin adalah kelompok biopolimer yang disintesis dari tyrosine yang berfungsi sebagai pigmen pemberi warna kulit, terdapat pada melanosit tepatnya di dalam organel terkait lisosom bermembran yang disebut melanosome ^{107,108}. Jumlah melanosit hanya 1% pada sel epidermal dan setiap sel melanosit pada lapisan basal kulit berasosiasi dengan 36 keratinosit dan 1 sel Langerhans ¹⁰⁸. Jenis hiperpigmentasi diantaranya adalah lentingines, melasma, hiperpigmentasi pasca inflamasi, dan lingkaran hitam di bawah mata ¹⁰⁸. Sebagian besar faktor yang menjadi penyebab hiperpigmentasi adalah respon inflamasi terhadap radiasi UV-B pada kulit ^{105,106,109}. UV-B adalah salah satu jenis

sinar UV yang dihasilkan dari paparan sinar matahari yang dapat diserap oleh kromofor kulit dan mempunyai panjang gelombang 280-320 nm yang dapat menembus seluruh lapisan epidermis dan lapisan atas dermis ^{109,110}.

Radiasi UVB menginduksi inflamasi melalui Reactive oxygen species (ROS) ^{106,109}. ROS akan mencetuskan sinyal cedera DAMP yang kemudian berikatan dengan TLR¹¹⁰. Ikatan DAMP-TLR mengaktifasi berbagai jalur inflamasi NF- κ B dan MAPK pada sel radang ¹¹⁰. Aktivasi jalur pensinyalan NF- κ B dan MAPK dapat meregulasi gen inflamasi diferensiasi monosit M0 menjadi makrofag M1 yang diekspresikan oleh CD68 ¹¹¹. Aktivasi jalur tersebut memicu ekspresi kemokin MIP-1 α sebagai kemoatraktan M1 menuju area cedera. M1 memproduksi sitokin proinflamasi IL-1, TNF- α , dan IL-6 ¹¹¹.

Mediator inflamasi tersebut secara parakrin akan mengaktifasi melanosit¹⁰⁸. Sebagian besar TLR yang berikatan dengan sitokin inflamasi juga dapat memicu teraktivasi MAPK sehingga menimbulkan peningkatan ekspresi MITF ¹¹⁰. Peningkatan ekspresi MITF kemudian menyebabkan sintesis melanin dengan meningkatkan TYR, tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) dan tyrosinase-related protein 2 (TYRP2) ¹⁰⁸. Melanosit mengaktifkan jalur MITF untuk menghasilkan enzim tyrosinase yang berfungsi untuk mengubah tirosin asam amino menjadi pigmen melanin sehingga melanosit melepas lebih banyak melanin dalam bentuk melanosome sebagai respon perlindungan lebih lanjut terhadap sinar UV ^{100,101,103}. Melanosom melalui proses internalisasi keratinosit menyebabkan

granul melanin tersebar pada epidermis¹⁰⁵. Makrofag M1 akan melakukan fagositosis pada sel keratinosit yang mengalami cedera¹⁰⁵. Sel tersebut mengandung melanosome berisi granul melanin sehingga proses fagositosis akan menyebabkan akumulasi melanofag menyebabkan tampilan kulit lebih gelap¹¹⁰.

2.7 Efek Exosome MSCs terhadap Ekspresi Gen FGF dan TRP pada Mencit yang dipapar Sinar UV-B

Degradasi *collagen* adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UV sebelum terjadinya hiperpigmentasi. Penetrasi UV-B pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS dan mengaktifkan protein kinase sehingga mengaktifkan jalur NF- κ B dan berujung pada produksi molekul-molekul proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 serta produksi *matrix metalloproteinase* (MMPs) yang menginduksi degradasi *collagen*.¹⁰⁴

Exosome MSCs mengandung berbagai komponen yang disekresikan oleh MSCs berupa sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan yang terdiri dari IL-10, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platet Derived Growth Factor* (PDGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), dan TGF- β .^{22,23} Molekul soluble yang disekresikan MSCs termasuk IL-10 dan TGF- β mengendalikan kerusakan kulit akibat radiasi sinar UVB dengan merangsang fibroblast menghasilkan *collagen*.^{24,25} Menghambat dalam pembentukan melanin dan meredam inflamasi.²⁶ Hasil penelitian

melaporkan bahwa paparan sinar UV-B yang menyebabkan hiperpigmentasi diatur oleh gen, protein dan enzim, yaitu *Tyrosinase*, MITF, TRP-1 dan TRP-22.²⁷ Sinar UV memicu *Tyrosinase* yang bertanggung jawab dalam hidroksilasi L-tyrosine menjadi L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). L-DOPA selanjutnya dioksidasi menjadi L-DOPA kuinon untuk dibentuk menjadi eumelanin dan pheomelanin dalam jalur produksi melanin.¹⁴

Exosome MSCs diyakini sebagai terapi yang menjanjikan dalam pengobatan regeneratif, dengan menghindari tumorigenisitas dan penolakan imun. Proses biologis SASP berkaitan erat dengan penuaan seluler. *Exosome* adalah jenis vesikel ekstraseluler (diameter 30-150 nm) yang disekresikan oleh MSCs. *Exosome* yang diturunkan dari MSCs mengandung berbagai molekul bioaktif termasuk protein, RNA (mRNA, miRNA), lipid, dan faktor pemberi sinyal lainnya. *Exosome* yang diturunkan dari MSC dapat mengurangi produksi ROS dan kerusakan oksidatif pada berbagai jenis sel, termasuk keratinosit dan sel kulit yang terkena radiasi UV. dapat mendorong sel untuk melanjutkan siklus sel setelah DNA damage repair, yang penting untuk reparasi dan regenerasi jaringan.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UV-B menyebabkan kerusakan langsung pada DNA dan komponen seluler lainnya, yang mengarah pada produksi ROS. ROS ini termasuk radikal bebas seperti superoksida ($O_2^{\bullet-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($\bullet OH$). ROS yang dihasilkan oleh UVB dapat mengaktifkan jalur kinase yang diatur oleh mitogen (MAPK). Tiga jalur utama MAPK yang terlibat adalah ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), dan p38 MAPK radiasi sinar UV-B secara terus menerus dapat menginduksi ROS pada kulit. Selanjutnya MAPK akan mengaktifkan MITF yang menyebabkan peningkatan produksi enzim Tyrosinase yang mempercepat perubahan L-tyrosine menjadi L-DOPA yang merupakan sumber utama terbentuknya Melanin¹⁰⁵. Teraktivasi MITF memicu pelepasan enzim Tyrosinase dan TRP¹⁰⁵. Tyrosine yang terakumulasi dengan adanya enzim Tyrosinase akan menghasilkan produksi DOPA. Katalis yang sama akan menyebabkan DOPA berubah menjadi Dopachrom. Dari sini maka akan terbentuk dua jalur dari Dopachrom untuk menghasilkan melanin. Fase pertama yaitu mengubah DOPA menjadi Sisteinildopa kemudian menghasilkan Eumelanin. Fase kedua yaitu dimulai dengan Dopachrome, yang kemudian menjadi Dopachrome. TRP-2 yang diaktifkan oleh MITF, mengubah Dopachrom menjadi Asam Dihidroksiindole Karboksilat. TRP 1 yang kemudian setelah

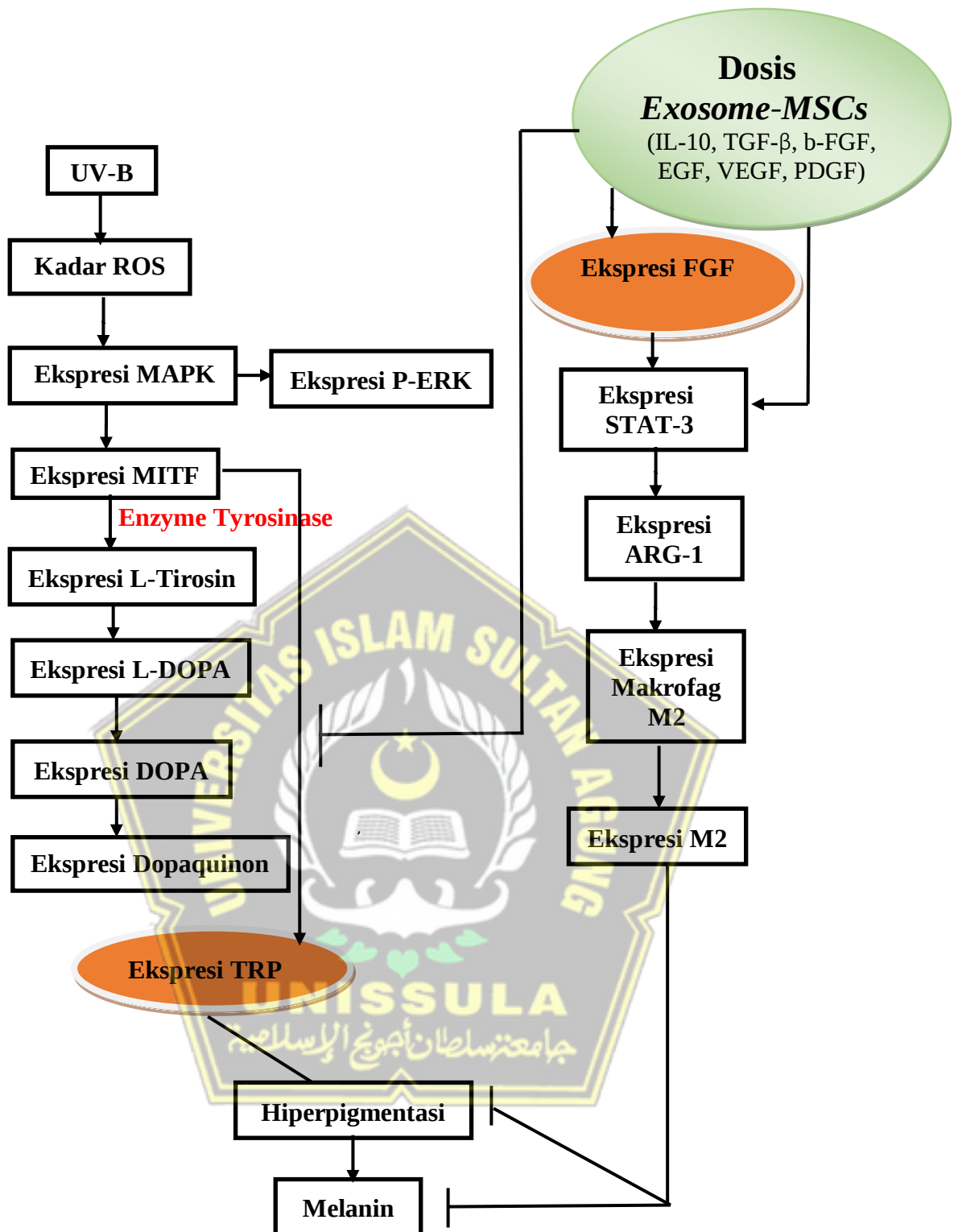
itu dapat mengubah asam ini menjadi Asam Indolequinone Karboksilat, yang membentuk Melanin (pigmen hitam pada kulit) ¹¹³.

E-MSCs diduga mengekspresikan molekul soluble berupa Sitokin, Kemokin dan Growth Factor (GF) seperti IL-10, TGF- β , b-FGF, EGF, VEGF, dan PDGF ¹¹⁴. *Exosome* yang berasal dari MSCs ini memberikan efek pada polarisasi makrofag. *Exosome* menyebabkan pelemahan yang signifikan pada peradangan melalui Polarisasi Makrofag M2 dan mendorong Polarisasi M2 melalui Transaktivasi Arginase-1 oleh STAT3 aktif yang dibawa *Exosome* ¹⁶.

Pemberian *Exosome* secara injeksi *sub cutan*, dapat membuat area lesi lebih mudah menerima *Exosome* terapeutik. Selain itu, *Exosome* yang dikirimkan juga dapat bersifat kemotaktik pada lokasi inflamasi atau lokasi cedera ketika terdapat jarak antara area yang diberikan dan pusat lesi. Dengan beragam molekul bioaktif yang terdapat dalam *E-MSCs*, *Exosome* dapat memberikan manfaat kuratif, sehingga menghasilkan efek biologis yang lebih baik. *Exosome* yang dilepaskan dapat mencapai sel targetnya melalui cara Parakrin atau melalui sirkulasi dan kemudian diinternalisasi oleh sel penerima dengan cara Interaksi Ligan-Reseptor; Endositosis yang dimediasi molekul permukaan, Mikropinositosis, Fagositosis; atau Fusi membran plasma dengan sel penerima. Setelah pelepasan isi *Exosome* tertutup di sitoplasma penerima, perubahan jalur sinyal intraseluler terjadi pada sel penerima untuk memodulasi proses dan fungsi seluler ³². Dengan demikian menunjukkan bahwa *Exosome-MSCs* yang mengandung

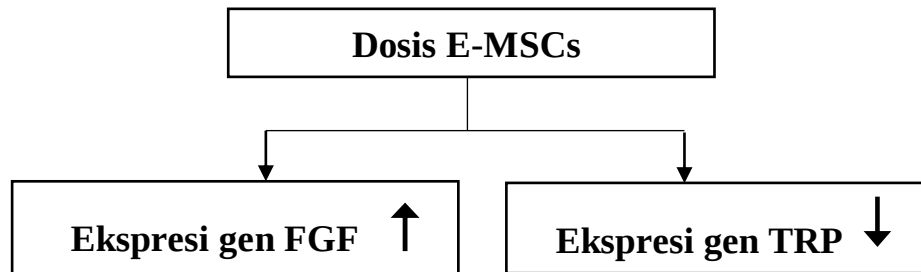
komponen spesifik MSCs untuk memberikan efek spesifik pada sel penerima, yang setara dengan efek terapeutik MSCs ¹⁶ . Mekanisme ini secara kolektif membantu melindungi kulit dari kerusakan yang diinduksi oleh UV-B dan menjaga integritas *collagen* sehingga dapat memperbaiki dan menghambat terjadinya Melanin.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah Pemberian *Exosome Mesenchymal Stem Cells* (E-MSCs) hypoxia dapat meningkatkan ekspresi gen FGF dan menurunkan ekspresi gen TRP pada Mencit C57BL Jantan model hiperpigmentasi dipapar sinar UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12 .

BAB IV

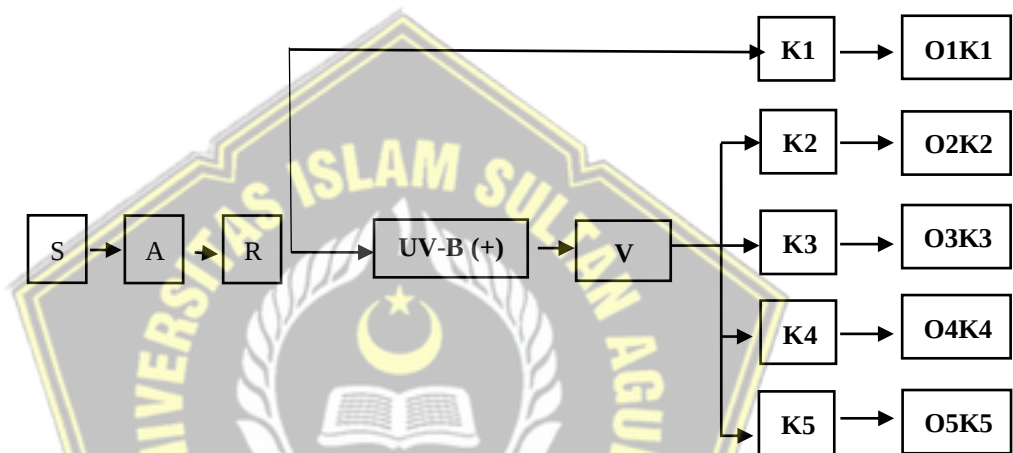
METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* yang menggunakan rancangan penelitian berupa *Post Test Only Control Group* dengan metode rancang acak lengkap menggunakan hewan coba Mencit C57BL Jantan sebagai objek penelitian yang dipapar sinar UV-B. Pemilihan *Post Test Only Control Group Design* dilakukan karena desain ini memungkinkan evaluasi efek paparan sinar UV-B pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol secara terpisah pada akhir penelitian, sehingga memungkinkan identifikasi perbedaan akibat intervensi perlakuan E-MSCs tersebut. Dengan menggunakan kelompok kontrol yang tidak diberi intervensi perlakuan pasca terpapar sinar UV-B, penelitian dapat lebih spesifik dalam menilai dampak langsung dari E-MSCs terhadap paparan sinar UV-B terhadap tikus objek penelitian yang mengalami degradasi *collagen* dan hiperpigmentasi. Objek penelitian adalah Mencit C57BL Jantan dengan berat badan 20-25 gr berumur 6-8 minggu , dengan 5 kelompok penelitian dengan rincian sebagai berikut (Gambar 4.1) :

1. K1 (Mencit C57BL sehat tanpa penyinaran UV-B),
2. K2 (Kontrol negatif = Mencit C57BL dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan, NaCl 0,9% secara *sub cutan*)

3. K3 (Kontrol positif = Mencit C57BL dipapar UV-B dengan pemberian kontrol positif injeksi Retinol dosis 200uL secara *sub cutan*).
4. K4 (Mencit C57BL dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs 200uL secara *sub cutan*),
5. K5 (Mencit C57BL dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs 300uL secara *sub cutan*).



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Sample

A : Aklimatisasi

R : Randomisasi

V : Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan *Masson Fontana*

K1 : Mencit C57BL sehat tidak diberi perlakuan

K2 : Mencit C57BL dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan, NaCl 0,9%
sub cutan

K3 : Mencit C57BL dipapar UV-B diberi perlakuan injeksi Retinol 0,1%
dosis 200uL secara *sub cutan*

K4 : Mencit C57BL dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara
sub cutan

K5 : Mencit C57BL dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan*

O1K1 : Observasi ekspresi gen FGF dan TRP pada Kelompok 1

O2K2 : Observasi ekspresi gen FGF dan TRP pada Kelompok 2

O3K3 : Observasi ekspresi gen FGF dan TRP pada Kelompok 3

O4K4 : Observasi ekspresi gen FGF dan TRP pada Kelompok 4

O5K5 : Observasi ekspresi gen FGF dan TRP pada Kelompok 5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

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

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat : ekspresi gen FGF dan gen TRP

4.2.1.3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah sinar UV-B.

4.2.1.4. Variabel Terkendali

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

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. E-MSCs

E-MSCs adalah vesikel yang terbentuk dari fusi endosomal badan multivesikuler dengan plasma membran

MSCs. E-MSCs dihasilkan melalui isolasi dari kultur MSCs *passage* ke -4 dengan metode sentrifugasi. E-MSCs kemudian di simpan dalam suhu 2-8⁰C.

4.2.2.2. Injeksi sub cutan E-MSCs

Injeksi sub cutan E-MSCs adalah Exosome dari MSCs yang telah di sentrifugasi dan di sterilisasi dengan metode filtrasi melalui nilon filter 0,22um dan di tempatkan pada spuit 1 ml dengan needle 26G untuk diinjeksikan secara *sub cutan* yaitu pada punggung Mencit C57BL model dengan dosis 200uL dan 300uL.

Satuan: uL (mikroliter)

Skala: rasio

4.2.2.3. Ekspresi gen FGF

FGF adalah protein yang memiliki peran penting sebagai pengatur siklus sel yang dianalisis dari kulit yang diambil pada hari ke 22. Sampel jaringan kulit sebanyak 5 mg di area penyinaran diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode *reverse transcriptase - polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase. Pengukuran dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia.

Satuan: Ekspresi relatif (Ekspresi Gen FGF/ekspresi house keeping Gen GAPDH)

Skala : Rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen TRP

TRP adalah protein yang terlibat dalam mengatur perkembangan siklus sel sebagai penyeimbang akibat tingginya kadar ROS iradiasi UV-B yang dianalisis dari kulit yang diambil pada hari ke 22. Sampel jaringan kulit sebanyak 5 mg di area penyinaran diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase. Pengukuran dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia.

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

Skala : Rasio

4.2.2.5. Sinar UV-B

Dalam penelitian ini, sinar UV-B merujuk kepada radiasi UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B *narrowband* tipe TLF72-100W/12. Paparan sinar UV-B dilakukan selama 5 hari. Dosis paparan sinar UV-B dengan UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *Minimal Erythema Dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 9 menit/hari dengan jarak 20cm selama 3 kali seminggu pada hari ke 1, 3, dan 5 selama 2 minggu ⁷⁹.

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan mencit C57BL jantan berumur 6-8 minggu dan bobot 20-25 g, yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang diperoleh dari SCCR Indonesia yang dipapar sinar UV *light (broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 9 menit/hari dengan jarak 20cm selama 3 kali seminggu pada hari ke 1,3,dan 5 selama 2 minggu ⁷⁹ hingga berkurangnya densitas *collagen* dan terjadi hiperpigmentasi.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mencit C57BL jantan yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan UV-B yang dihasilkan oleh perangkat UV-B Narrowband tipe TLF72-100W/12 .
2. Umur 6-8 minggu.
3. Kondisi sehat.
4. Berat badan 20-25 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Mencit C57BL jantan dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tidak mengalami hiperpigmentasi.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Mencit mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Mencit C57BL jantan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K1 (mencit sehat tanpa paparan UV-B), K2 (mencit dipapar UV-B tanpa perlakuan), K3 (mencit dipapar UV-B dengan perlakuan injeksi Retinol 0,1% dosis 200uL secara *sub cutan*), K4 (mencit dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan*) dan K5 (mencit dipapar UV-B dengan perlakuan E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan*)

4.3.4. Besar Sampel

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

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

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

$$4n-4 \geq 19$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Keterangan:

t = banyaknya perlakuan

n = banyak sampel setiap perlakuan

Perhitungan dengan menggunakan Rumus *Federer* didapatkan jumlah mencit 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 5 ekor mencit perkelompok, dengan tambahan 1 mencit perkelompok sebagai cadangan.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

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

1. UV-B *light* (broadband dengan *peak emission* pada 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm²
2. Pisau cukur
3. Kandang paparan
4. Kandang pemeliharaan
5. Tempat air minum mencit
6. Pemotong rambut
7. *Vacutainer*
8. Tabung hematokrit
9. 6 mm *biopsy punch*

10. Sentrifuge
11. Mikropipet 1
12. 1000 uL mikropipet tip
13. *vial tube* 1,5 mL
14. *PCR machine illumina*
15. Mikroskop
16. *Staining jar*
17. *Coated desk glass*
18. *Cover glass*
19. Laptop.

4.4.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan yang terdiri :

1. Ketamin
2. *Xylazine*
3. Etanol
4. Aquades
5. Oroform
6. Primer FGF
7. Primer TRP

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Penelitian dimulai dengan pengajuan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang. Langkah ini diambil setelah mendapatkan persetujuan proposal penelitian dari pembimbing dan penguji. Permohonan persetujuan etik ini diperlukan untuk memastikan bahwa penelitian dilakukan sesuai dengan prinsip-prinsip etika dalam penggunaan hewan percobaan. Selain itu, persetujuan etik juga menjamin bahwa perlakuan terhadap hewan coba akan dilakukan dengan memperhatikan kesejahteraan dan hak-hak hewan, serta meminimalkan penderitaan yang tidak perlu.

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

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

1. *Umbilical cord* beserta janin mencit dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* beserta janin mencit diletakkan ke petri dish, kemudian dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin mencit dan pembuluh darah dibuang.

4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konflensi 80%.

4.5.3. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow*

Cytometry

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BDTM accutaseTM *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment soluution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1x10⁷ sel /ml di dalam BD PharmingenTM Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline* (PBS)

buffer. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.

2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen *Flow Cytometry* (Tabel 4.1).
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel kedalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.
7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
8. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam *flow cytometry*

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

7	hMSC <i>positive cocktail</i>	20µl
	PE hMSC <i>negative cocktail</i>	20µl

4.5.4. Isolasi *Exosome* MSCs hypoxia

1. *Condition medium* yang sudah dikoleksi dari passage 4, kemudian di sentrifuge 300xg selama 5 menit untuk menghilangkan sel, selanjutnya di sentrifuge 2000xg selama 30 menit untuk menghilangkan debris.
2. *Supernatant* yang sudah di sentrifuge kemudian di filtrasi dengan metode TFF (*Tangential Flow Filtration*) menggunakan *sterile hollow fiber polyether-sulfone membrane* 10, 50, 500 kD.
3. MSCs yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
4. Flask yang telah berisi MSCs kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
5. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oksigen-meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
6. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
7. *Chamber* yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

8. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration* (TFF) untuk mendapatkan hipoksia MSCs-Exosome.
9. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500µl *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
10. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

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

1. Mencit yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kg BB) dan xylazine (20mg/kg BB).
2. Rambut pada bagian punggung tikus di potong hingga bersih.
3. Punggung tikus dipapar dengan UV *light* (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 9 menit/hari selama 14 hari⁷⁹.
4. Mencit K3 kemudian diberi perlakuan secara subkutan menggunakan E-MSCs yang diberikan satu kali pada hari ke-15 selama 7 hari. Mencit pada K4 diberi perlakuan secara sub cutan menggunakan E-MSCs yang diberikan satu kali pada hari ke -15 selama 7 hari.

4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan sampel jaringan untuk analisis RT-PCR dilakukan pada hari ke-22 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh mencit dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UV-B. Sampel jaringan dibagi menjadi dua untuk difiksasi dengan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam dan untuk dimasukkan ke dalam RNA Later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian disimpan dalam suhu -80°C hingga proses analisis RT-PCR.

4.5.7. Pembuatan Blok Parafin.

1. Dehidrasi

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

2. Parafinisasi dan Embedding

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

4.5.8. Validasi Hiperpigmentasi Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan

Validasi makroskopi berupa terbentuk blackspot atau pembentukan melanin dilakukan pada hari ke-15 setelah radiasi dengan perangkat UVB narrowband tipe TLF72-100W/12. UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan Minimal Erythema Dose (MED) 160 mJ/cm² durasi penyinaran 8 menit. Validasi mikroskopis menggunakan metode blok parafin dan pewarnaan Masson Fontana dengan prosedur sebagai berikut:

1. Sampel kulit mencit pada semua kelompok diambil dan difiksasi dalam larutan NBF 10%.
2. Sampel kulit dibilas dengan alkohol 70% sampai bersih dari sisa larutan fiksatif.
3. Sampel kulit dimasukkan ke dalam alkohol 70% , 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 30 menit untuk

proses dehidrasi.

4. Sampel kulit dimasukkan ke dalam toluol sampai jernih atau transparan selama 1 jam.
5. Infiltrasi ke dalam parafin dilakukan di dalam oven pada suhu 56-60°C dengan cara memasukkan sampel kulit ke dalam campuran toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Sampel kulit dimasukkan ke dalam parafin murni I, paraffin murni II, dan parafin murni III masing-masing perlakuan selama 30 menit.
6. Embedding, sampel kulit dari parafin murni ditanamkan ke dalam cetakan blok parafin yang telah berisi parafin cair dan ditunggu hingga parafin mengeras.
7. Sampel kulit dalam blok parafin diiris dengan ketebalan irisan sebesar 6 μm menggunakan mikrotom.
8. Irisan sampel jaringan ditempelkan pada gelas benda dengan cara mengoleskan Mayer's albumin dan ditetesi sedikit akuades lalu dipanaskan di atas hot plate hingga irisan menempel dengan sempurna.
9. Sediaan histologis dideparafinasi dengan cara dimasukkan ke dalam xylol selama 24 jam.
10. Staining (pewarnaan) dilakukan dengan pewarna Masson Fontana dengan prosedur sebagai berikut:
 - a. Slide dibersihkan dengan aquades.

- b. Slide yang dijadikan sebagai kontrol ditambahkan 10 tetes reagen B dan 10 tetes reagen C , dibiarkan selama 20 menit, dan dibilas dengan akuades. Setelah itu, ditambahkan 10 tetes reagen D dan dibiarkan selama 5 menit kemudian dibilas dengan akuades.
- c. Box Inkubasi disiapkan , slide kontrol dan slide specimen diletakkan pada box inkubasi, kemudian ditambahkan 10 tetes reagen A pada slide, box inkubasi ditutup dan diinkubasi overnight.
- d. Slide dicuci dengan aquades kemudian reagen E, dibiarkan selama 5 menit.
- e. Dibilas dengan aquades.
- f. Ditambahkan 10 tetes reagen F dan dibiarkan selama 10 menit.
- g. Dibilas dengan aquades.
- h. Slide dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat, kemudian dilakukan proses mounting.
- i. Slide diamati menggunakan mikroskop untuk mempelajari komposisi dan struktur jaringan, khususnya melanin.

4.5.9. Analisis Kuantitatif Ekspresi gen FGF dan TRP menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan

cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA syntesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad). Penentuan Ekspresi Gen FGF dan TRP

2. Penentuan Ekspresi Gen FGF dan TRP

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

4.6. Langkah Penelitian

1. Persiapkan 30 ekor mencit C57BL jantan berumur 6-8 minggu dan bobot 20-25 g yang telah diadaptasi selama 7 hari.
2. Bius mencit dengan campuran ketamin dan xylazine
3. Cukur punggung mencit seluas 2x3 cm
4. Lakukan penyinaran pada punggung mencit dengan sinar UV-B dengan dosis minimal UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 9 menit/hari sebanyak 3 kali seminggu selama 2 minggu dengan jarak 20cm⁷⁴.

5. Setelah mencit yang terpapar UV-B tervalidasi mengalami hiperpigmentasi, berikan perlakuan pada mencit sesuai kelompoknya K1, K2, K3, K4, dan K5 sebanyak 1 kali pada hari ke 15 hari.
6. Hari ke-22, mencit diterminasi dan diambil biopsy jaringan kulit yang terpapar UV-B untuk pemeriksaan qRT-PCR
7. Periksa ekspresi FGF dan TRP menggunakan qRT-PCR adalah sebagai berikut:
 - a. Isolasi RNA: isolasi RNA dari sampel kulit dengan menggunakan tryzole RNA isolation reagen, tambahkan kloroform dan vortex hingga homogen. Selanjutnya dilakukan setrifugasi dengan kecepatan 12.000G selama 15 menit untuk mengisolasi fase air yang mengandung RNA. Fase air yang mengandung RNA dimurnikan dengan isopropanol dan dipisahkan dengan sentrifugasi kembali. Pelet yang terbentuk dari hasil sentrifugasi dicuci dengan etanol.
 - b. Sintesis cDNA: Sintesis cDNA dilakukan dengan cDNA sintesis kit II menggunakan alat PCR. RNA yang telah diisolasi dihitung kadarnya dengan nanodrop dan dilakukan sintesis cDNA.
 - c. Analisis qRT-PCR: Analisis qRT-PCR dengan menggunakan primer spesifik FGF dan TRP dengan menggunakan reagen sybr green II.
 - d. Analisis Data: Hasil cq value pada analisis qRT-PCR dibandingkan dengan housekeeping gen GAPDH dan dihitung nilai persentasenya.

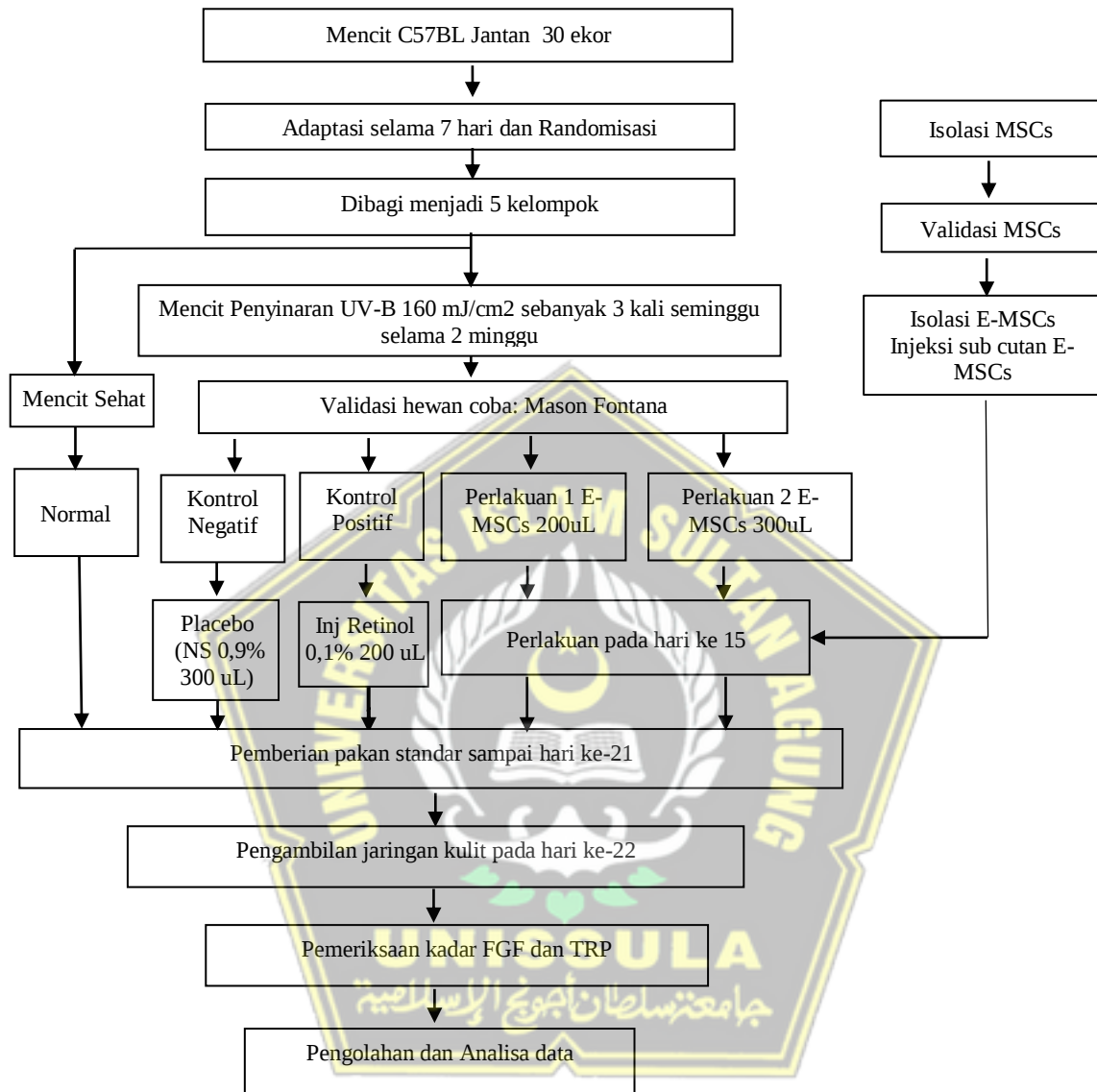
4.7. Tempat dan Waktu Penelitian

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

4.8. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Uji ekspresi gen α -SMA diperoleh data normal ($P>0,05$), namun tidak homogen ($P<0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Terdapat perbedaan signifikan ($p<0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p<0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Data densitas *collagen* memiliki sebaran data tidak normal ($p<0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Terdapat perbedaan signifikan ($p<0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p<0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.

4.9. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Eksperimental dilakukan pada bulan Oktober sampai November 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang Indonesia. Subjek penelitian yaitu mencit C57BL jantan berumur 6-8 minggu dan bobot 20-25 gr yang di induksi sinar UV-B 302 nm dengan intensitas energi 160 mJ/cm. Penelitian menggunakan 30 mencit C57BL jantan dan tidak ada tikus *drop out* selama penelitian berlangsung. Penelitian terdiri dari 5 kelompok yaitu kelompok (K1) kontrol mencit C57BL sehat tanpa perlakuan , kelompok (K2) kontrol negatif pemberian NS 0,9% , kelompok (K3) kontrol positif adalah 6 hewan coba yang diberikan injeksi *sub cutan* Retinol 0,1% dosis 200 μ L, kelompok (K4) terdiri dari 6 hewan coba dengan pemberian injeksi *sub cutan* E-MSCs dosis 200 μ L dan kelompok (K5) terdiri dari 6 hewan coba dengan pemberian injeksi *sub cutan* E-MSCs dosis 300 μ L.

Pengamatan secara makroskopis dilakukan untuk melihat adanya Hiperpigmentasi akibat paparan sinar UV-B dan berdasarkan hasil pengamatan terlihat adanya Hiperpigmentasi pada mencit yang terpapar sinar UV-B dibandingkan dengan yang tidak terpapar sebagaimana terlihat pada (**Gambar 5.1**). Selain itu untuk memperkuat validasi, analisis secara anatomi dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *Masson Fontana* untuk melihat densitas elastin akibat paparan sinar UV-B. Berdasarkan penelitian terdahulu, melanin dapat terlihat sebagai gambaran berwarna hitam dengan pewarnaan *Masson Fontana*.

Berdasarkan hasil pengamatan secara anatomi didapatkan hasil bahwa terjadi Hiperpigmentasi pasca paparan sebagaimana yang ditunjukkan pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1. A) Mencit kelompok sehat warna kulit normal, (B) Mencit yang diberi paparan UVB terlihat kulit berwarna gelap, (C) Pigmen melanin normal pada mencit sehat, (D) Pigmen melanin mencit yang terpapar UVB sudah mengalami hiperpigmentasi.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Validasi MSCs

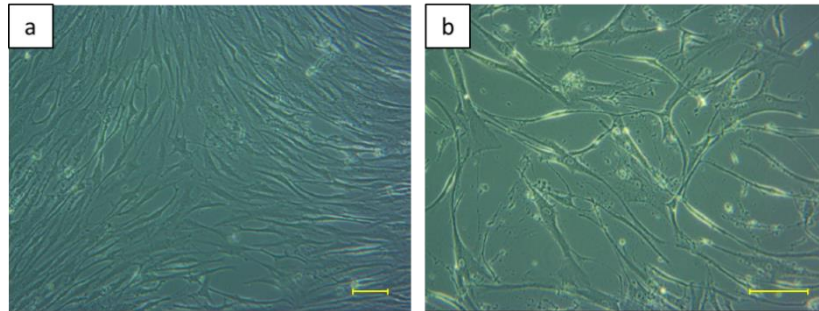
Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang Indonesia, menggunakan *umbilical cord* mencit bunting usia 19 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask kultur dengan medium khusus. Hasil kultur MSCs setelah pasage ke-4 didapatkan gambaran sel yang

melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle shape*

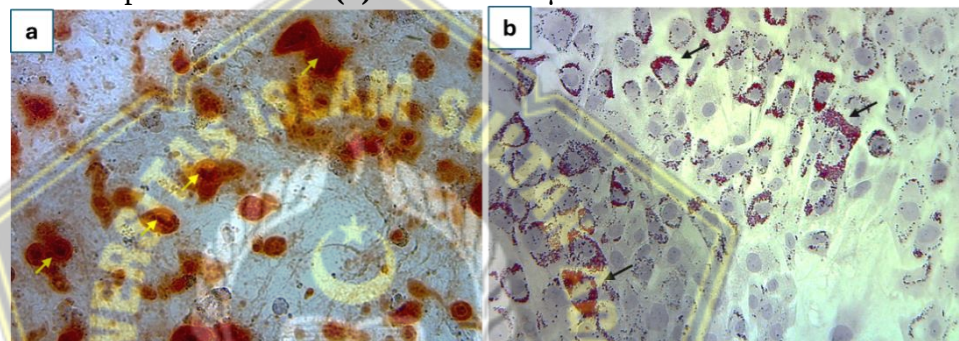
5.1.1.1. Diferensiasi Osteogenik dan Adipogenik

Sel MSCs dikultur dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik selama 14 hari untuk mengetahui kemampuan diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit. Berdasarkan pengamatan mikroskop pada perbesaran 100x dan 200x, morfologi sel kultur hasil isolasi memiliki bentuk lonjong, panjang, inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol yang menyerupai fibroblast dan melekat pada dasar flask plastik (*plastic adherent*) (**Gambar 5.2**).

Gambaran diferensiasi osteogenik MSCs ditunjukkan oleh sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarin Red* (**Gambar 5.3a**). Diferensiasi adipogenik MSCs ditunjukkan oleh sel yang berisi akumulasi droplet lipid dengan pewarnaan *Oil Red O* (**Gambar 5.3b**). Deposisi kalsium dan lemak hasil diferensiasi MSCs menjadi osteosit dan adiposit ditunjukkan dengan warna merah pada masing-masing kultur.



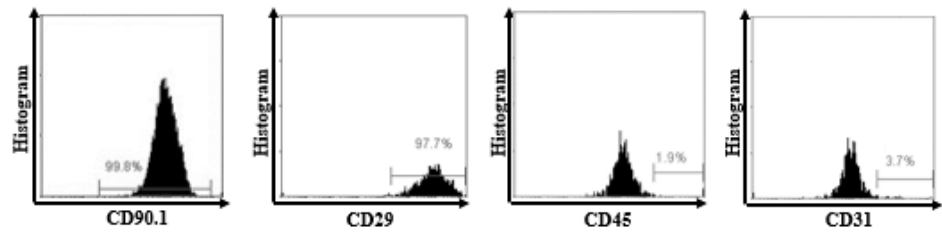
Gambar 5.2. Karakter morfologi sel hasil Isolasi. Morfologi sel hasil Isolasi memiliki karakter seperti MSC yaitu berbentuk bulat lonjong inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol (*fibroblas-like*) dengan perbesaran mikroskop 100x **(a)** dan perbesaran 200x **(b)**. Scale bar: 50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



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

5.1.1.2. Surface Marker

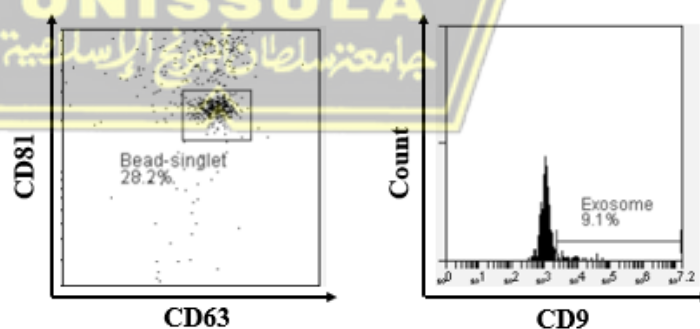
Hasil isolasi MSCs divalidasi menggunakan *Flow Cytrometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *Surface Marker* khusus. Hasil secara kuantitatif berupa persentase ekspresi positif CD 90.1 (99,8%), CD 29 (97,7%), dan ekspresi negatif dari CD 45 (1,9%), dan CD 31 (3,7%) (**Gambar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



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

5.1.1.3. Validasi *Exosome*

Medium MSCs yang diduga berisi *exosome* dilakukan filtrasi menggunakan teknik *Tangential Flow Filtration* (TFF), lalu persentase *Exosome* dianalisis menggunakan metode *Flow Cytometry*. Hasil analisis menunjukkan bahwa teknik filtrasi berhasil mengisolasi *Exosome* sebesar 9.1% (**Gambar 5.6**) dengan nilai kadar *Exosome* rata-rata adalah 7,5 ug/mL.



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

5.1.2. Efek Pemberian E-MSCs terhadap Ekspresi Gen FGF

Penelitian *Exosome Mesencymal Stem Cell* terhadap ekspresi gen FGF dan ekspresi gen TRP pada mencit C57BL jantan yang di induksi paparan sinar UV-B dan diberi perlakuan telah dilakukan selama 21 hari. Hasil penelitian tersebut tertera pada (Tabel 5.1)

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada ekspresi FGF dan ekspresi TRP

Variabel	Kelompok				Sig.(p)
	K2 (n=6)	K3 (n=6)	K4 (n=6)	K5 (n=6)	
Ekspresi FGF					
Mean	0,68 ± 0,46	1,72 ± 1,04	3,69 ± 1,46	4,87 ± 2,51	
Std.deviasi					
Shapiro Wilk**	0,430	0,001	0,264	0,021	
Levene test***					0,153
Kruskall				0,001*****	
Wallis*****					
Ekspresi TRP					
Mean	1,07 ± 0,52	0,74 ± 0,50	0,39 ± 0,18	0,22 ± 0,10	
Std.deviasi					
Shapiro Wilk*	0,399	0,091	0,688	0,278	
Levene test***					0,167
ANOVA *****				0,005*****	

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

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi FGF terendah yaitu pada kelompok perlakuan (K2) Mencit dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9%, selanjutnya diikuti oleh kelompok perlakuan (K3) Mencit dipapar UV-B diberi perlakuan Retinol 0,1%

dosis 200uL secara *sub cutan*, selanjutnya kelompok perlakuan (K4) Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan*, kemudian diikuti kelompok perlakuan (K5) Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan*. Seluruh kelompok kadar ekspresi FGF berdasarkan uji *Shapiro Wilk* berdistribusi tidak normal dengan nilai $p\text{-value} < 0.05$ dan uji homogenitas dengan menggunakan *Lavene Test* hasilnya homogen nilai $p\text{-value}$ ($p > 0.05$) maka analisis data menggunakan uji *Kruskall Wallis*. Hasil uji *Kruskall Wallis* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai $p\text{-value}$ 0.004 ($p < 0.05$), kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

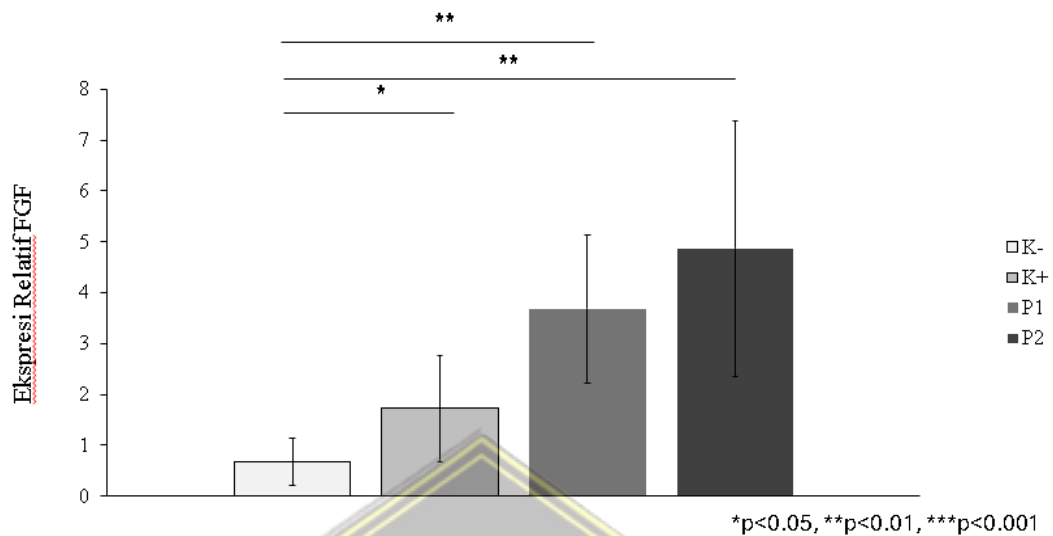
Tabel 5.2. Perbedaan Ekspresi FGF Antar 2 Kelompok

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
Ekspresi FGF	K2	*K3	0,016
		*K4	0,004
		*K5	0,004
	K3	*K4	0,010
		*K5	0,010
	K4	K5	0,749

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

Hasil uji *Mann Whitney* pada **Tabel 5.2** dan **Gambar 5.6** menunjukkan ekspresi FGF pada kelompok Mencit dipapar UV-B

tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan (K3) Mencit dipapar UV-B diberi perlakuan Retinol 0,1% dosis 200uL secara *sub cutan* nilai p-value 0,016 ($p < 0,05$), kelompok Mencit dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan* (K4) nilai p-value 0,004 ($p < 0,05$), kelompok Mencit dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan* (K5) nilai p-value 0,004 ($p < 0,05$), Kemudian kelompok perlakuan (K3) Mencit dipapar UV-B diberi perlakuan Retinol 0,1% dosis 200uL secara *sub cutan* terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan* (K4) nilai p-value 0,010 ($p < 0,05$), kelompok perlakuan (K3) Mencit dipapar UV-B diberi perlakuan Retinol 0,1% dosis 200uL secara *sub cutan* terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan* (K5) nilai p-value 0,010 ($p < 0,05$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian E-MSCs dosis 200 μ L dan 300 μ L berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi FGF pada mencit C57BL jantan yang dipapar UV-B, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.6. Ekspresi Relatif gen FGF pada jaringan kulit mencit model hiperpigmentasi pada semua kelompok. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

5.1.3. Efek Pemberian E-MSCs terhadap Ekspresi TRP

Rerata ekspresi TRP terendah yaitu pada pada kelompok perlakuan(K5) Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan*, selanjutnya diikuti kelompok perlakuan (K4) Tikus dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan*, selanjutnya diikuti kelompok perlakuan (K3) Mencit dipapar UV-B diberi perlakuan Retinol 0,1% dosis 200uL secara *sub cutan*, selanjutnya diikuti kelompok perlakuan (K2) Mencit dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9%. Seluruh kelompok kadar ekspresi TRP berdasarkan uji *Shapiro Wilk* berdistribusi normal dengan nilai p-value >0.05 dan uji homogenitas dengan menggunakan *Lavene Test* hasilnya homogen nilai p-value (p>0.05) maka analisis data menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova*

menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai p-value 0,001 ($p < 0.05$), kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh..

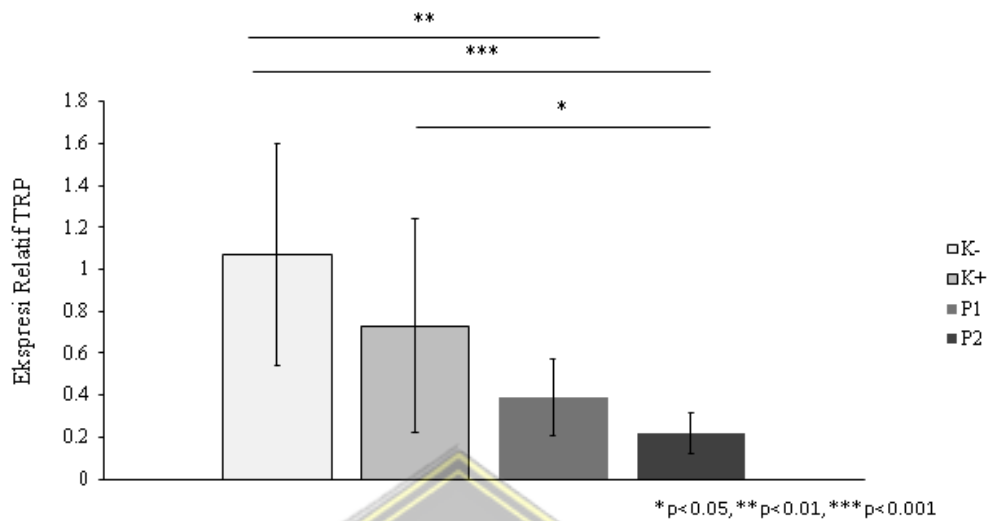
Tabel 5.3. Perbedaan Ekspresi TRP Antar 2 Kelompok

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
				Batas Bawah	Batas Atas
Ekspresi TRP	K2	K3	0,144	-0,1232	0,7865
		*K4	0,005	0,2252	1,1348
		*K5	0,001	0,3885	1,2982
	K3	K2	0,144	-0,7865	0,1232
		K4	0,126	-0,1065	0,8032
		*K5	0,029	0,0568	0,9665
	K4	*K2	0,005	-1,1348	-0,2252
		K3	0,126	-0,8032	0,1065
		K5	0,463	-0,2915	0,6182
	K5	*K2	0,001	-1,2982	-0,3885
		*K3	0,029	-0,9665	-0,0568
		K4	0,463	-0,6182	0,2915

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

Hasil uji *Post Hoc* LSD pada **Tabel 5.3** dan **Gambar 5.7** menunjukkan ekspresi TRP pada kelompok Mencit dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan* (K4) dengan nilai p-value 0,005 ($p < 0,05$), kelompok Mencit dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan* (K5) dengan

nilai p-value 0,001 ($p < 0,05$). Kemudian kelompok perlakuan (K3) Mencit dipapar UV-B diberi perlakuan Retinol 0,1% dosis 200uL secara *sub cutan* terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan* (K5) dengan nilai p-value 0,029 ($p < 0,05$). Kemudian kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 200uL secara *sub cutan* (K4) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) dengan nilai p-value 0,005 ($p < 0,05$). Kemudian kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan* (K5)) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok Mencit dipapar UV-B tanpa diberi perlakuan NaCl 0,9% (K2) dengan nilai p-value 0,001 ($p < 0,05$), kelompok Mencit dipapar UV-B diberi E-MSCs dosis 300uL secara *sub cutan* (K5)) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan (K3) Mencit dipapar UV-B diberi perlakuan Retinol 0,1% dosis 200uL secara *sub cutan* dengan nilai p-value 0,029 ($p < 0,05$) Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian E-MSCs dosis 200μL dan 300μL berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi TRP pada mencit C57BL jantan yang dipapar UV-B, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.7. Ekspresi Relatif mRNA TRP pada jaringan kulit mencit model Hiperpigmentasi pada semua kelompok. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

5.2. Pembahasan

Paparan sinar UV-B menyebabkan kerusakan langsung pada DNA dan komponen seluler lainnya, yang mengarah pada produksi ROS. ROS yang dihasilkan oleh UVB dapat mengaktifkan jalur kinase yang diatur oleh mitogen (MAPK). Tiga jalur utama MAPK yang terlibat adalah ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), dan p38 MAPK radiasi sinar UV-B secara terus menerus dapat menginduksi ROS pada kulit. Selanjutnya MAPK akan mengaktifasi MITF yang menyebabkan peningkatan produksi enzim Tyrosinase yang mempercepat perubahan L-tyrosine menjadi L-DOPA yang merupakan sumber utama terbentuknya Melanin ¹⁰⁵. Teraktivasi MITF memicu pelepasan enzim Tyrosinase dan TRP ¹⁰⁵. Tyrosine yang terakumulasi dengan adanya enzim Tyrosinase akan menghasilkan produksi DOPA. Katalis yang sama akan

menyebabkan DOPA berubah menjadi Dopachrome. Dari sini maka akan terbentuk dua jalur dari Dopachrome untuk menghasilkan melanin. Fase pertama yaitu mengubah DOPA menjadi Sisteinildopa kemudian menghasilkan Eumelanin. Fase kedua yaitu dimulai dengan Dopachrome, yang kemudian menjadi Dopachrome. TRP-2 yang diaktifkan oleh MITF, mengubah Dopachrome menjadi Asam Dihidroksiindole Karboksilat. TRP 1 yang kemudian setelah itu dapat mengubah asam ini menjadi Asam Indolequinone Karboksilat, yang membentuk Melanin (pigmen hitam pada kulit) ¹¹³.

Hasil analisis menunjukkan bahwa E-MSCs dosis 200µl dan 300µl mampu secara signifikan meningkatkan ekspresi gen FGF. Hal tersebut dikarenakan E-MSCs diduga mengekspresikan molekul soluble berupa Sitokin, Kemokin dan Growth Factor (GF) seperti IL-10, TGF-β, b-FGF, EGF, VEGF, dan PDGF ¹¹⁴. *Exosome* yang berasal dari MSCs ini memberikan efek pada polarisasi makrofag. *Exosome* menyebabkan pelemahan yang signifikan pada peradangan melalui Polarisasi Makrofag M2 dan mendorong Polarisasi M2 melalui Transaktivasi Arginase-1 oleh STAT3 aktif yang dibawa *Exosome* ¹⁶, sehingga dapat menghambat hiperpigmentasi dan terbentuknya melanin.

Hasil analisis menunjukkan bahwa E-MSCs dosis 200µl dan 300µl juga mampu secara signifikan menurunkan ekspresi gen TRP. Hal tersebut dikarenakan E-MSCs diduga mengekspresikan molekul soluble berupa Sitokin, Kemokin dan Growth Factor (GF) seperti IL-10, TGF-β, b-FGF,

EGF, VEGF, dan PDGF¹¹⁴. Kandungan senyawa aktif ini diduga akan menghambat MITF, dengan terhambatnya MITF maka pembentukan Enzym Tyrosinase dan TRP akan terhambat pula. Mekanisme ini yang akan menghambat hiperpigmentasi dan terbentuknya melanin.

5.3. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah tidak melakukan analisis *pathway* utama mengenai bagaimana E-MSCs mampu menghambat *Reactive Oxygen Species* (ROS), apakah melalui *pathway* Sirt1/PGC1a, PI3K/Akt/MAPK, atau NFκβ. Jalur biokimia yang terlibat dalam respon degradasi *collagen* dan hiperpigmentasi sangat kompleks. Penelitian ini mungkin tidak sepenuhnya menjelaskan interaksi antara berbagai jalur dan faktor lain yang mungkin terlibat. Studi lanjutan diperlukan untuk memetakan secara lebih rinci mekanisme molekuler yang mendasari.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat peningkatan ekspresi gen FGF secara signifikan pada mencit model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B setelah diberi E-MSCs secara *sub cutan* dengan dosis 200 μ l dan 300 μ L dibandingkan kontrol secara *in vivo*.
2. Terdapat penurunan ekspresi gen TRP secara signifikan pada mencit model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B setelah diberi E-MSCs secara *sub cutan* dengan dosis 200 μ l dan 300 μ L dibandingkan kontrol secara *in vivo*.

6.2. Saran

Diharapkan studi yang akan datang dapat menganalisis *pathway* utama mengenai bagaimana E-MSCs mampu menghambat *Reactive Oxygen Species* (ROS), apakah melalui *pathway* Sirt1/PGC1 α , PI3K/Akt/MAPK, atau NF-kB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Herrling Th, Jung K, Fuchs J. *Spectrochimica Acta Bagian A: Spektroskopi Molekuler dan Biomolekuler*. 2006; 63 :840–845.
2. Davies KJA, Pryor WA. *Biologi & Pengobatan Radikal Bebas*. 2005; 39 :1263.
3. Son DJ, Jung JC, Choi YM, Ryu HY, Lee S, Davis BA. Wheat extract oil (WEO) attenuates UVB-induced photoaging via collagen synthesis in human keratinocytes and hairless mice. *Nutrients* 2020. doi:10.3390/nu12020300.
4. Kang YM, Hong CH, Kang SH, Seo DS, Kim SO, Lee HY *et al*. Anti-photoaging effect of plant extract fermented with *Lactobacillus buchneri* on CCD-986sk fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *J Funct Biomater* 2020. doi:10.3390/jfb11010003.
5. Green AC, Hughes MCB, McBride P, Fourtanier A. Factors associated with premature skin aging (photoaging) before the age of 55: A population-based study. *Dermatology* 2011. doi:10.1159/000322623.
6. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017; **1863**: 585–597.
7. Shin JM, Kim MY, Sohn KC, Jung SY, Lee HE, Lim JW *et al*. Nrf2 negatively regulates melanogenesis by modulating PI3K/Akt signaling. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0096035
8. He X, Dong Z, Cao Y, Wang H, Liu S, Liao L *et al*. MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing. 2019; **2019**.
9. Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S *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**: 1–7.

10. Gromkowska-Kępa KJ, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, Socha K. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging — review of in vitro studies. *J Cosmet Dermatol* 2021;20(11):3427-3431. doi:10.1111/jocd.14033
11. Cristina Sitanggang T. JURNAL MEDIA SAINS 3 (2): 71-77 Krim Astaxanthin Mencegah Peningkatan Melanin Kulit Marmut (*Cavia porcellus*) yang Dipapar Sinar Ultraviolet B Astaxanthin Cream Prevents Increased Melanin in Guinea Pig Skin Exposed by Ultraviolet Light B. Published online 2019.
12. Alam MB, Bajpai VK, Lee JI, et al. Inhibition of melanogenesis by jineol from *Scolopendra subspinipes mutilans* via MAP-Kinase mediated MITF downregulation and the proteasomal degradation of tyrosinase. *Sci Rep*. 2017;7(December 2016):1-12. doi:10.1038/srep45858
13. Choi H, Choi H, Han J, et al. IL-4 Inhibits the Melanogenesis of Normal Human Melanocytes through the JAK2 – STAT6 Signaling Pathway. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;133(2):528-536. doi:10.1038/jid.2012.331
14. 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:10.425/wjsc.v14.i5.318
15. 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
16. 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

17. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442
18. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol.* 2018;98(10):924-931. doi: 10.2340/00015555-3002
19. Fabian IM, Sinnathamby ES, Flanagan CJ, et al. Topical Hydroquinone for Hyperpigmentation: A Narrative Review. *Cureus.* 2023;15(11). doi:10.7759/cureus.48840
20. Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *J Biomed Technol Res.* 2014;1(1):1-21. doi:10.19104/jbtr.2014.107
21. 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
22. Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 β maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):1-15. doi:10.3390/ijms21020465
23. Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(6 24-6):1196-1202.. do 10.1152/ajplung.2001.280.6.11196
24. Abreu SC, Weiss DJ, Rocco PRM. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: A therapeutic option in respiratory diseases? *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):1-10. doi:10.1186/s13287-016-0317-0
25. Roh E, Kim JE, Kwon JY, Park JS, Bode AM, Dong Z *et al.* Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017. doi :10.1080/10408398.2014.1003365
26. Liu F, Qu L, Li H, et al. Advances in Biomedical Functions of Natural Whitening Substances in the Treatment of Skin Pigmentation Diseases. *Pharmaceutics.* 2022;14(11). doi:10.3390/PHARMACEUTICS14112308

27. Cichorek M. Postępy Dermatologii i Alergologii.pdf. Published online 2013
28. Carita AC, Eloy JO, Chorilli M, Lee RJ, Leonardi GR. Recent Advances and Perspectives in Liposomes for Cutaneous Drug Delivery. *Curr Med Chem*. 2017;25(5):606-635. doi:10.2174/0929867324666171009120154
29. Bi Y, Xia H, Li L, et al. Liposomal vitamin D3 as an anti-aging agent for the skin. *Pharmaceutics*. 2019;11(7). doi:10.3390/pharmaceutics11070311
30. Desmet E, Van Gele M, Lambert J. Topically applied lipid- and surfactant-based nanoparticles in the treatment of skin disorders. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017;14(1):109-122. doi:10.1080/17425247.2016.1206073
31. Guo S, Perets N, Betzer O, et al. Intranasal Delivery of Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Loaded with Phosphatase and Tensin Homolog siRNA Repairs Complete Spinal Cord Injury. *ACS Nano*. 2019;13(9):10015-10028. doi:10.1021/acsnano.9b01892
32. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
33. Zhang Y, Pan Y, Liu Y, Li X, Tang L, Duan M *et al*. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor- β receptor inhibition. *Stem Cell Res Ther* 2021; 12. doi:10.1186/s13287-021-02517-0.
34. Hu S, Li Z, Cores J, Huang K, Su T, Dinh PU *et al*. Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging. *ACS Nano* 2019; 13: 11273–11282.
35. You Y, Tian Y, Yang Z, Shi J, Kwak KJ, Tong Y *et al*. Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy. *Nat Biomed Eng* 2023; 7: 887–900
36. Li J, Li Z, Wang S, Bi J, Huo R. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit production of extracellular matrix in keloid fibroblasts via downregulating transforming growth factor- β 2 and Notch-1 expression. *Bioengineered* 2022; 13: 8515–8525.

37. Tutuianu R, Rosca AM, Iacomi DM, Simionescu M, Titorencu I. Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote in vitro wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis. *Int J Mol Sci* 2021; 22. doi:10.3390/ijms22126239.
38. Park GH, Kwon HH, Seok J, et al. Efficacy of combined treatment with human adipose tissue stem cell-derived exosome-containing solution and microneedling for facial skin aging: A 12-week prospective, randomized, split-face study. *J Cosmet Dermatol.* 2023;22(12):3418-3426 doi:10.1111/JOCD.15872
39. Cho BS, Lee J, Won Y, et al. Skin Brightening Efficacy of Exosomes Derived from Human Adipose Tissue-Derived Stem/Stromal Cells: A Prospective, Split-Face, Randomized Placebo-Controlled Study. *Cosmetics* 2020, Vol 7, Page 90. 2020;7(4):90. doi:10.3390/COSMETICS7040090
40. He X, Dong Z, Cao Y, et al. MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells Int.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/7132708
41. Adelipour M, Sorkheh H, Kiani Z, et al. Umbilical cord as a source of mesenchymal stem cells improves melasma in parturients: a clinical randomized trial. *Physiology and Pharmacology (Iran)*. 2023;27(1):9-15. doi:10.52547/PHYPPHA.27.1.7
42. Zhu Z, Zhang X, Hao H, et al. Exosomes Derived From Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Treat Cutaneous Nerve Damage and Promote Wound Healing. *Front Cell Neurosci.* 2022;16.
43. Ardizzone A., Scuderi SA, Giuffrida D., Colarossi C., Puglisi C., Campolo M., Cuzzocrea S., Esposito E., Paterniti I. Peran Reseptor Faktor Pertumbuhan Fibroblast (FGFR) pada Tumor Otak, Fokus pada Astrocytoma dan Glioblastoma. *Cancers*. 2020; 12 :3825. doi: 10.3390/cancers12123825.
44. Litwack G. Bab 16—Hormon Steroid. Dalam: Litwack G., editor. *Biokimia Manusia*. Academic Press; Cambridge, MA, AS: 2018. hlm. 467–506.

45. Gadaleta RM, Moschetta A. Pembawa Pesan Metabolik: Faktor pertumbuhan fibroblast 15/19. *Nat. Metab.* 2019; 1 :588–594. doi: 10.1038/s42255-019-0074-3
46. Sarabipour S., Hristova K. Mekanisme dimerisasi dan aktivasi reseptor FGF. *Nat. Commun.* 2016; 7 :10262. doi: 10.1038/ncomms10262.
47. Katoh M. Reseptor faktor pertumbuhan fibroblast sebagai target pengobatan dalam onkologi klinis. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2019; 16 :105–122. doi: 10.1038/s41571-018-0115-y.
48. Zhang F., Zhang Z., Lin X., Beenken A., Eliseenkova AV, Mohammadi M., Linhardt RJ Analisis komposisi heparin/heparan sulfat yang berinteraksi dengan kompleks FGF•FGFR. *Biokimia.* 2009; 48 :8379–8386. doi:10.1021/bi9006379
49. Xie Y., Su N., Yang J., Tan Q., Huang S., Jin M., Ni Z., Zhang B., Zhang D., Luo F., dkk. Sinyal FGF/FGFR dalam kesehatan dan penyakit. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020; 5 :1–38. doi: 10.1038/s41392-020-00222-7
50. Katoh M. Terapi yang Menargetkan Jaringan Sinyal FGF pada Penyakit Manusia. *Trends Pharmacol. Sci.* 2016; 37 :1081–1096. doi: 10.1016/j.tips.2016.10.003.
51. Scholle LM, Lehmann D., Deschauer M., Kraya T., Zierz S. FGF-21 sebagai Biomarker Potensial untuk Penyakit Mitokondria. *Curr. Med. Chem.* 2018; 25 :2070–2081. doi: 10.2174/0929867325666180111094336.
52. Stanier P., Pauws E. Perkembangan Bibir dan Langit-langit: Pemberian Sinyal FGF. *Tooth Mov. Oral Biol.* 2012; 16 :71–80. doi: 10.1159/000337618.
53. Itoh N., Ohta H., Nakayama Y., Konishi M. Peran Sinyal FGF dalam Perkembangan, Kesehatan, dan Penyakit Jantung. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016; 4 :110. doi: 10.3389/fcell.2016.00110.
54. Fukagawa M., Kazama JJ FGF23: Perannya dalam penyakit tulang ginjal. *Pediatr. Nephrol.* 2006; 21 :1802–1806. doi: 10.1007/s00467-006-0230-3.

55. Guo Y.-C., Yuan Q. Faktor pertumbuhan fibroblast 23 dan mineralisasi tulang. *Int. J. Oral Sci.* 2015; 7 :8–13. doi: 10.1038/ijos.2015.1.
56. Kanda E., Yoshida M., Sasaki S. Penerapan faktor pertumbuhan fibroblast 23 untuk evaluasi risiko fraktur vertebra dan penyakit ginjal kronis-penyakit tulang mineral pada pasien penyakit ginjal kronis lanjut usia. *BMC Nephrol.* 2012; 13 :122. doi: 10.1186/1471-2369-13-122.
57. Kurpas A., Supeł K., Idzikowska K., Zielińska M. FGF23: Tinjauan tentang Perannya dalam Metabolisme Mineral dan Penyakit Ginjal dan Kardiovaskular. *Dis. Markers.* 2021; 2021 :1–12. doi: 10.1155/2021/8821292.
58. Ping Q., Yan R., Cheng X., Wang W., Zhong Y., Hou Z., Shi Y., Wang C., Li R. Fibroblas terkait kanker: Gambaran umum, kemajuan, tantangan, dan arah. *Cancer Gene Ther.* 2021; 28 :984–999. doi: 10.1038/s41417-021-00318-4
59. Bai Y., Shang K., Chen H., Ding F., Wang Z., Liang C., Xu Y., Sun M., Li Y. Sinyal FGF -1/-3/ FGFR 4 pada fibroblas terkait kanker mendorong perkembangan tumor pada kanker usus besar melalui Erk dan MMP - 7. *Cancer Sci.* 2015; 106 :1278–1287. doi: 10.1111/cas.12745.
60. Tovar V., Cornella H., Moeini A., Vidal S., Hoshida Y., Sia D., Peix J., Cabellos L., Alsinet C., Torrecilla S., dkk. Sel pemicu tumor dan pensinyalan IGF/FGF berkontribusi terhadap resistensi sorafenib pada karsinoma hepatoseluler. *Usus.* 2017; 66 :530–540. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309501.
61. Mandal M., Bandyopadhyay D, Goepfert TM, Kumar R. Interferon menginduksi ekspresi inhibitor kinase dependen siklin p21^{WAF1} dan p27^{Kip1} yang mencegah aktivasi kinase dependen siklin oleh CDK-activating kinase (CAK) *Oncogene.* 1998; 16 :217–225.
62. Kong B., Huang J., Zhu Y., Li G., Williams J., Shen S., Aleksunes LM, Richardson JR, Apte U., Rudnick DA, dkk. Defisiensi faktor pertumbuhan fibroblast 15 mengganggu regenerasi hati pada tikus. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 2014; 306 :G893–G902. doi: 10.1152/ajpgi.00337.2013

63. Clapham DE. Saluran TRP sebagai sensor seluler. *Nature*. 2003; 426 (6966):517–524.
64. Voets T, dkk. Penginderaan dengan saluran TRP. *Nat Chem Biol*. 2005; 1 (2):85–92.
65. Van den Eynde C, Vriens J, De Clercq K. Pengaturan saluran potensial reseptor sementara oleh faktor pertumbuhan. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2021; 1868 (4):118950.
66. De Clercq K, dkk. Ekspresi fungsional saluran potensial reseptor sementara pada sel stroma endometrium manusia selama fase luteal siklus menstruasi. *Hum Reprod*. 2015; 30 (6):1421–1436.
67. Malcolm P, Galle S, De Clercq D. Optimasi eksoskeleton cepat. *Science*. 2017; 356 (6344):1230–1231.
68. Hennes A, dkk. Ekspresi fungsional saluran PIEZO1 mekanosensitif pada sel epitel endometrium primer dan organoid endometrium. *Sci Rep*. 2019; 9 (1):1779.
69. Van den Eynde C, De Clercq K, Vriens J. Saluran potensial reseptor sementara dalam transisi epitel ke mesenkim. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (15):8188.
70. Bruce JIE, James AD. Menargetkan mesin pensinyalan kalsium dalam kanker. *Cancers*. 2020; 12 (9):2351. doi: 10.3390/cancers12092351.
71. Yang D, Kim J. Peran baru saluran transient receptor potential (TRP) dalam perkembangan kanker. *BMB Rep*. 2020; 53 (3):125–132.
72. Canales J, dkk. TR(i)P ke migrasi sel: peran baru saluran TRP dalam mekanotransduksi dan kanker. *Front Physiol*. 2019; 10 :757.
73. Yanofsky C (Februari 1981). "Pelemahan dalam pengendalian ekspresi operon bakteri". *Nature*. 289(5800): 751–8. Bibcode:1981Natur.289..751Y. doi:10.1038/289751a0
74. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C *et al*. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells* 2019; 12: 218–226

75. Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems* 2018.
76. Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis* 2011. doi:10.5772/21325.
77. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. 2019; **38**: 164–171.
78. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 2019; **10**: 1–10.
79. Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014; : 135–156.
80. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep* 2016; **2**: 168–173.
81. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19092783.
82. Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells* 2019; **8**: 467.
83. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 552.
84. Wang L, Qin W, Zhou Y, Chen B, Zhao X, Zhao H *et al*. Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Sci Rep* 2017; : 1–8.
85. Kevin Range and DMYAM. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* 2012; **23**: 1–7.
86. Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al*. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad

- signaling. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; **116**: 351–358.
87. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004; **36**: 1482–1491.
88. Yang H, Li G, Wu JJ, Wang L, Uhler M, Simeone DM. Protein kinase a modulates transforming growth factor- β signaling through a direct interaction with Smad4 protein. *Journal of Biological Chemistry* 2013; **288**: 8737–8749.
89. Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 β maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–15.
90. Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
91. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958.
92. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; **2**: 5–10.
93. Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol Clin* 2010; **28**: 93–105.
94. Edwards QA, Lunat I, Neale LDG, Kulikov SM. Water-Organic Solvent Media. 2015; **13**: 1218–1226
95. Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
96. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958.
97. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; **2**: 5–10.

98. Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol Clin* 2010; **28**: 93–105.
99. Edwards QA, Lunat I, Neale LDG, Kulikov SM. Water-Organic Solvent Media. 2015; **13**: 1218–1226.
100. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SEG, Kang S, Fisher GJ *et al.* Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *American Journal of Pathology* 2006; **168**: 1861–1868.
101. Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 6098–6107.
102. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC *et al.* Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research* 2012; **32**: 428–438.
103. Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM. Hijacking of the AP-1 signaling pathway during development of ATL. *Front Microbiol* 2018; **8**: 1–13.
104. Fernandez F. BIOSYNTHESIS OF COLLAGEN Biochemical and Physicochemical Characterization of Collagen-Synthesizing Polyribosomes Preparation of the Ribosomal Suspension. *J Cell Biol* 1967; **33**: 27–42.
105. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004;36(8):1482-1491. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.023
106. 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;15:2555-2565. doi:10.2147/CCID.S385162/ASSET/79C6AC21-899E-4E9E-81DB-376860CEEDB0/ASSETS/GRAPHIC/DCCI_A_12152527_F0001_C.JPG

107. Thawabteh AM, Jibreen A, Karaman D, Thawabteh A, Karaman R. Skin Pigmentation Types, Causes and Treatment—A Review. *Molecules* 2023, Vol 28, Page 4839. 2023;28(12):4839. doi:10.3390/MOLECULES28124839
108. Diepgen TL, Mahler V. Photoprotective properties of skin melanin. *British Journal of Dermatology*. 2002;146(s61):7-10. doi:10.1046/J.1365-2133.146.S61.3.X
109. Maddodi N, Jayanthi A, Setaluri V. Shining Light on Skin Pigmentation: The Darker and the Brighter Side of Effects of UV Radiation. *Photochem Photobiol*. 2012;88(5):1075. doi:10.1111/J.1751-1097.2012.01138.X
110. Liu HM, Cheng MY, Xun MH, et al. Possible Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Skin Cellular Senescence, Inflammation, and Cancer and the Therapeutic Potential of Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 3755. 2023;24(4):3755. doi:10.3390/IJMS24043755
111. Sindhu S, Akhter N, Wilson A, et al. MIP-1 α Expression Induced by Co-Stimulation of Human Monocytic Cells with Palmitate and TNF- α Involves the TLR4-IRF3 Pathway and Is Amplified by Oxidative Stress. *Cells*. 2020;9(8). doi:10.3390/CELLS9081799
112. Liu F, Qu L, Li H, et al. Advances in Biomedical Functions of Natural Whitening Substances in the Treatment of Skin Pigmentation Diseases. *Pharmaceutics*. 2022;14(11). doi:10.3390/PHARMACEUTICS14112308
113. Kim SS, Kim MJ, Choi YH, et al. Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(8):617-622. doi:10.1016/S2221-1691(13)60125-2
114. 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