

**PENGARUH *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP KADAR MMP-3 DAN IL-6
(STUDI EKSPERIMENTAL *IN VIVO* PADA TIKUS GALUR
WISTAR MODEL *COLLAGEN LOSS* YANG DIPAPAR SINAR
UV-B)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister
(S2)



Magister Ilmu Biomedik

Fitri Anindyasarathi

MBK. 23.22.010385

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

TESIS

**PENGARUH *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP KADAR MMP-3 DAN IL-6
(STUDI EKSPERIMENTAL *IN VIVO* PADA TIKUS GALUR WISTAR
MODEL *COLLAGEN LOSS* YANG DIPAPAR SINAR UV-B)**

Disusun oleh :

Fitri Anindyasarathi

MBK. 23.22.010385

akan dipertahankan di depan Tim Penguji

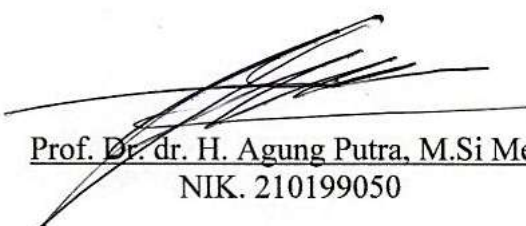
pada tanggal 3 Januari 2025

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,

Pembimbing II,



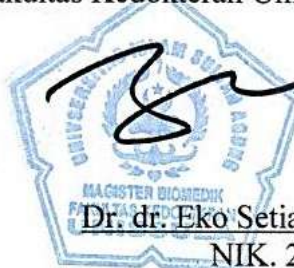
Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si Med
NIK. 210199050



Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes
NIK. 220198045

Mengetahui,

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



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

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan 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

Semarang, 15 Januari 2025



(Fitri Anindysarathi)

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Mahaesa, sehingga tesis penulis yang berjudul, “**PENGARUH *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP KADAR MMP-3 DAN IL-6 (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Galur Wistar Model *Collagen Loss* yang Dipapar Sinar UV-B)**” ini dapat terselesaikan.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., M. Hum 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 Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang
4. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si Med selaku dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
5. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.

6. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, 15 Januari 2025



(Fitri Anindyasarathi)

ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan kronis sinar UV-B menimbulkan tekanan oksidatif yang memicu pelepasan sitokin proinflamasi IL-6 sehingga menginduksi enzim MMP-3 untuk mengurai kolagen. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian HMSCs terhadap kadar MMP-3 dan IL-6 pada tikus model penurunan kolagen yang dipapar sinar UV-B.

Metode: Penelitian eksperimental pada hewan uji ini menggunakan rancangan penelitian berupa *posttest only control group* dengan metode rancang acak lengkap. Sinar UV-B dengan dosis MED 160mj/cm² dipaparkan selama 8 menit sebanyak 10 kali pada rentang dua minggu. Subjek pada penelitian ini merupakan tikus jantan galur wistar yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K1 (tikus sehat tanpa paparan UV-B), K2 (tikus dipapar UV-B tanpa perlakuan), K3 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HA dosis 200uL secara subkutan), K4 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HMSCs dosis 2,5x10⁵ sel secara subkutan) dan K5 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HMSCs dosis 5x10⁵ sel secara subkutan) yang diberikan pada hari ke 15. Setiap kelompok terdiri dari 5 hewan uji. Analisis kadar MMP-3 dan IL-6 dengan metode ELISA pada hari ke 22. Analisis data selanjutnya dilakukan uji normalitas, homogenitas, dan dilanjutkan dengan uji beda *one-way ANOVA* menggunakan SPSS versi 29.

Hasil: Pemberian HMSCs pada dosis 2,5x10⁵ dan 5x10⁵ sel secara signifikan menurunkan kadar IL-6 hingga 66,22 dan 42,19 pg/mL. Pemberian HMSCs juga menurunkan kadar MMP-3 secara signifikan, pada dosis 5x10⁵ sel dapat menurunkan kadar MMP-3 hingga 3329,00 pg/mL.

Kesimpulan: HMSCs memperbaiki kondisi collagen loss pada kulit akibat paparan sinar UVB melalui penghambatan IL-6 dan MMP-3.

Keywords: HMSCs, IL-6, MMP-3, collagen loss

ABSTRACT

Background: Chronic UV-B exposure induces oxidative stress, triggering the release of proinflammatory cytokine IL-6, which in turn induces MMP-3 enzyme to degrade collagen. This study aims to investigate the effect of HMSCs administration on MMP-3 and IL-6 levels in a rat model of collagen reduction exposed to UV-B radiation.

Methods: This experimental animal study employed a posttest-only control group design with a completely randomized method. UV-B radiation with a Minimal Erythema Dose (MED) of 160mj/cm² was applied for 8 minutes, 10 times over two weeks. Male Wistar rats were divided into 5 groups: K1 (healthy rats without UV-B exposure), K2 (UV-B exposed rats without treatment), K3 (UV-B exposed rats treated with 200µL HA subcutaneously), K4 (UV-B exposed rats treated with 2.5x10⁵ HMSCs subcutaneously), and K5 (UV-B exposed rats treated with 5x10⁵ HMSCs subcutaneously). Treatments were administered on day 15. Each group consisted of 5 animals. MMP-3 and IL-6 levels were analyzed using ELISA on day 22. Data analysis included normality and homogeneity tests, followed by one-way ANOVA using SPSS version 29.

Results: HMSCs administration at doses of 2.5x10⁵ and 5x10⁵ cells significantly reduced IL-6 levels to 66.22 and 42.19 pg/mL, respectively. HMSCs also significantly decreased MMP-3 levels, with the 5x10⁵ cell dose reducing MMP-3 levels to 3329.00 pg/mL.

Conclusion: HMSCs improve UVB-induced collagen loss in skin by inhibiting IL-6 and MMP-3.

Keywords: HMSCs, IL-6, MMP-3, collagen loss

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat penelitian	5
1.5.1. Manfaat Teoritis	5
1.5.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Matriks Metaloproteinase-3.....	10
2.1.1. Definisi MMP-3	10
2.1.2. Peran dan Mekanisme Seluler MMP-3 dalam Kolagen Loss	11
2.2. <i>Interleukin-6</i>	13
2.2.1. Definisi IL-6.....	13
2.3. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs)	16
2.3.1. Definisi MSCs	16
2.3.2. Sumber MSCs	17
2.3.3. Karakteristik MSCs	17
2.3.4. Peran MSCs.....	18
2.5. Efek HMSCs terhadap Kadar MMP-3 dan IL-6.....	27
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	30

3.1.	Kerangka Teori.....	30
3.2.	Kerangka Konsep	33
3.3.	Hipotesis	33
BAB IV METODE PENELITIAN		34
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	34
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	35
4.2.1.	Variabel Penelitian	35
4.2.2.	Defenisi Operasional.....	35
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	38
4.3.1.	Subjek Penelitian.....	38
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	38
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	39
4.3.4.	Besar Sampel.....	39
4.4.	Alat dan Bahan	40
4.4.1.	Alat.....	40
4.4.2.	Bahan	40
4.5.	Cara Penelitian.....	41
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	41
4.5.2.	Prosedur Isolasi <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	41
4.5.3.	Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow</i> <i>Cytometry</i> ^{103,104}	42
4.5.4.	Pembuatan Hypoksia MSCs (HMSCs).	44
4.5.5.	Penyinaran UV-B dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	44
4.5.6.	Pengambilan Sampel Darah	45
4.5.7.	Pembuatan Blok Parafin.....	45
4.5.8.	Validasi Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan Kolagen	46
4.5.9.	Analisis Kuantitatif Kadar MMP-3 dan IL-6 dengan metode ELISA	47

4.6.	Tempat dan Waktu Peneltian.....	47
4.7.	Analisa Data	47
4.8.	Alur Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		50
5.1.	Hasil Validasi <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>	52
5.2.	Hasil Penelitian.....	53
5.2.1.	Efek Pemberian HMSCs terhadap Kadar Interluekin-6.....	53
5.2.2.	Efek Pemberian HMSCs terhadap Kadar <i>Matrix Metaloproteinase-3</i>	57
5.3.	Pembahasan	60
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		67
6.1.	Kesimpulan.....	67
6.2.	Saran.....	68
DAFTAR PUSTAKA.....		69
LAMPIRAN.....		80



DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
HE	: <i>Hematoksin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>
MAPK	: <i>Mitogen-actived Protein Kinases v</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>

NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1 v</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Peran MMPs dalam proses penurunan kadar kolagen	12
Gambar 2.2 Jalur pensinyalan utama dalam hiperpigmentasi.....	16
Gambar 2.3 Sumber MSCs	17
Gambar 2.4 Kemampuan differensiasi MSCs.....	18
Gambar 2.5 Perbedaan kolagen pada kulit.....	20
Gambar 2.6 Sintesis kolagen.....	26
Gambar 2.7 Prokolagen.....	27
Gambar 3.1 Kerangka teori.....	31
Gambar 3.2 Kerangka konsep	32
Gambar 4.1 Alur rancangan penelitian	33
Gambar 4.2 Alur penelitian.....	48
Gambar 5.1 Validasi kolagen.....	51
Gambar 5.2 Validasi HMSCs.....	52
Gambar 5.3 Kadar IL-6.....	55
Gambar 5.4 Kadar MMP-3	57



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas penelitian	6
Tabel 4.1 Reagen yang digunakan dalam flowcytometry	42
Tabel 5.1 Hasil analisis rerata, uji normalitas, dan homogenitas	52
Tabel 5.2 Perbedaan kadar IL-6 antara kelompok penelitian	54
Tabel 5.3 Perbedaan kadar MMP-3 antara kelompok penelitian	56



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan kronik sinar *Ultraviolet B* (UVB) menimbulkan peningkatan kadar nitrit oksida (NO) dan *reactive oxygen species* (ROS) yang berdampak pada penurunan jumlah kolagen di kulit.¹⁻³ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa paparan UVB menyebabkan peningkatan ekspresi *matriks metalloproteinase* (MMPs) sehingga menyebabkan degradasi kolagen dan menghambat sintesis prokolagen. Disisi lain, overekspresi ROS akibat sinar UVB mengaktifkan *mitogenpactivated protein kinase* (MAPK) *pathway* yang menginduksi jalur *nuclear factor kappa- β* (NF- κ B) bertranslokasi ke nukleus. Aktivasi NF- κ B ini menginduksi transkripsi sitokin proinflamasi seperti interleukin-6 (IL-6), IL-1, TNF- α , dan IFN- γ . IL-6 terbukti menginduksi ekspresi MMP-3 dan MMP-1 yang menyebabkan penekanan sintesis kolagen. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa MSCs dapat menekan inflamasi dan stress oksidatif, dengan menekan produksi IL-6.^{4,5} Keunggulan pemberian *hipoxia mesenchymal stem cells* (HMSCs) dibanding dengan senyawa lain diantaranya adalah HMSCs adalah sel biologis ini tidak memiliki sifat imunogenisitas, sehingga tidak menimbulkan efek samping.^{6,7} Potensi HMSCs sebagai alternatif untuk mencegah *colagen loss* pada kulit akibat paparan sinar UVB.⁸ Namun, eksplorasi tentang pengaruh HMSCs terhadap kadar MMP-3 dan IL-6 data masih sedikit, sehingga perlu di eksplorasi untuk mengetahui efek injeksi

subkutan pada dosis $2,5 \times 10^4$ sel dan 5×10^4 sel⁸ terhadap kadar MMP-3 dan IL-6 pada kulit tikus jantan galur wistar model kolagen *loss* yang diinduksi iradiasi UVB secara *in vivo*.⁸

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa 83% orang berusia dibawah 30 tahun mengalami penurunan kolagen akibat paparan UVB yang berakibat munculnya kerutan dan penurunan elastisitas kulit.⁹ Pada tahun 2015, 4.2% dari 142 subjek positif mengalami penurunan kolagen setelah terpapar tiga kali UVB *minimal erythema dose* (MED).¹⁰ Kasus wrinkle dan pigmentasi semakin meningkat pada tahun 2020 hingga ~100.350 kasus baru.¹¹ Pengobatan standar pada penurunan kolagen kulit berfokus pada perlindungan terhadap paparan UVB serta perbaikan kerusakan jaringan dengan menggunakan bahan kimia seperti *hyaluronic acid* (HA).¹² HA dapat menginduksi kolagen dengan mekanisme membentuk ikatan pada reseptor CD44 di kulit sehingga mengaktifkan signaling cascades untuk menstimulasi sintesis kolagen. HA juga telah terbukti meningkatkan efek growth factor seperti TGF- β and menginduksi proliferasi fibroblast yang dapat meningkatkan jumlah *collagen-producing cells*.^{12,13} Penggunaan HA terus menerus dapat menimbulkan efek samping seperti alergi, reaksi kemerah, dehidrasi berlebihan pada kulit hingga menyebabkan kanker.^{12,14,15} Kultur sel primer yang terpapar UVB 40-60% nya menunjukkan peningkatan sitokin proinflamasi IL-6 dan penurunan ekspresi berbagai *growth factor*¹⁶, seperti PDGF, TGF- β , dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF)¹⁷ serta peningkatan produksi MMPs.⁵ Peningkatan MMPs ini menyebabkan

mencegahan sintesis kolagen, dan terjadinya proses inflamasi yang berperan pada pigmentasi kulit.^{18,19}

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa interleukin-10 (IL-10) dapat menekan kadar ROS dengan meningkatkan Nrf2 melalui jalur NF- κ B.^{20,21} HMSCs dapat menginduksi pelepasan sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan *growth factor* seperti transforming *growth factor*- β (TGF- β), VEGF, *Platet Derived Growth Factor* (PDGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)^{22,23} yang dapat menginduksi peningkatan kadar kolagen²⁴. IL-10 dan TGF- β yang diinduksi oleh HMSCs terbukti mampu mengendalikan kerusakan kulit akibat radiasi sinar UVB menurunkan kadar ROS²⁵, menurunkan inflamasi dan menginduksi produksi kolagen.^{26,27} Dari uraian di atas diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas HMSCs terhadap kadar MMP-3 dan IL-6 pada tikus model *collagen loss* dipapar sinar UV-B.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat dirumuskan adalah "Apakah terdapat pengaruh pemberian HMSCs secara injeksi subkutan terhadap kadar MMP-3 dan kadar IL-6 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian HMSCs secara injeksi subkutan terhadap kadar MMP-3 dan kadar IL-6 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain untuk :

- a. Mengetahui kadar MMP-3 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara injeksi subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dibandingkan kontrol negatif dan kontrol positif HA dosis 200uL secara *in vivo*.
- b. Mengetahui kadar MMP-3 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara injeksi subkutan dengan dosis 5×10^5 sel dibandingkan kontrol negatif dan kontrol positif HA dosis 200uL secara *in vivo*.
- c. Mengetahui kadar IL-6 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara injeksi subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dibandingkan kontrol negatif dan kontrol positif HA dosis 200uL secara *in vivo*.

- d. Mengetahui kadar IL-6 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara injeksi subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dibandingkan kontrol negatif dan kontrol positif HA dosis 200uL secara *in vivo*.

1.4. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teori adalah memberikan ilmu pengetahuan bahwa pemberian HMSCs terhadap kadar MMP-3 dan kadar IL-6 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B.

1.5.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah :

1. Memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh HMSCs terhadap kadar MMP-3 dan kadar IL-6 pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi dengan sinar UV-B.
2. Penelitian lebih lanjut diharapkan dapat diaplikasikan bagi masyarakat.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

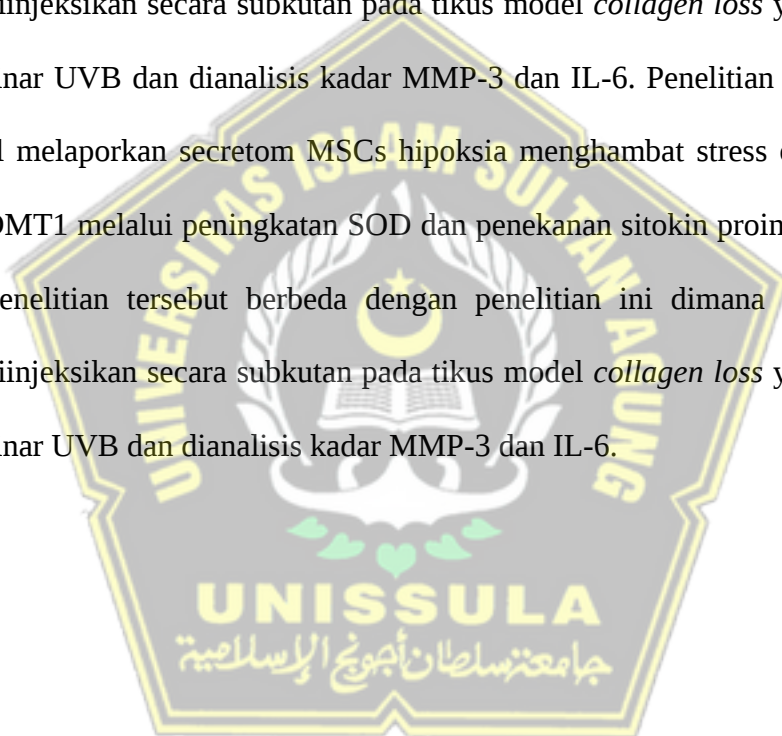
No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Se-Ra Park, Jae-Wan Kim, Hee-Sook Jun, Yoo Young Roh, Hwa-Yong Lee, In-Sun Hong, 2017 ²⁸	Stem Cell and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing	<i>In vitro</i> , eksperimental	MSCs meningkatkan kemampuan proliferasi sel kulit seperti fibroblast, keratinosit, dan epitel vascular, meningkatkan perbaikan kulit
2	Shiqi Hu, Zhenhua Li, Jhon Cores, Ke Huang, Teng Su, Phuong-Uyen Dinh, Ke Cheng, 2019 ²⁹	Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging	<i>In vitro</i> , eksperimental	MSCs 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, Yu Tian, Zhaogan g Yang, Junfeng Shi, Kwang Joo Kwak, Yuhao Tong, Jianhong Cao,	Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy	<i>In vitro</i> , eksperimental	Pemberian MSCs meningkatkan produksi collagen A1, dan mencegah degradasi ekstra seluler matriks

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
	Wei0Hsiang Hsu, 2023 ³⁰			
4	Sudha Balasubramanian, Chara Thej, Ankita Wavekar, Priyanka Swamyathan, Pawan K Gupta, Ravirajan Seetharam, Anish S Majumdar, 2017 ³¹	Evaluation of the Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation	<i>In vitro</i> , eksperimental	MSCS menghambat aktivasi Extra Cellular Matrix (ECM)/MMP sehingga terjadi sintesis kolagen.
5	Natalia Basalova, Georgy Sagaradze, Mikhail Abartskiy, Evgeniy Evtushenko, Natalia Kalinina, 2019 ³²	Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles	<i>In vitro</i> , eksperimental	MSCS mencegah diferensiasi myofibroblas dan pembentukan ECM yang dapat menyebabkan turunnya produksi kolagen.
6	Ayuningtias Utami, Agung Putra, Joko	Hypoxic secretome mesenchymal stem cells inhibiting interleukin-6 expression prevent oxidative stress in	<i>In vivo</i> , eksperimental	Secretome MSCs hipoksia menghambat stress oksidatif pada DMT1 melalui peningkatan SOD dan penekanan

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
	Wahyu Wibowo, Nur Dina Amalina, Risky Chandra Irawan, 2023 ⁸	type 1 diabetes mellitus		sitokin proinflamasi IL-6.

MSCs dapat meningkatkan kemampuan proliferasi sel kulit seperti fibroblast, keratinosit, dan epitel vascular, meningkatkan perbaikan kulit.²⁸ Hasil tersebut diatas berbeda dengan penelitian ini dimana HMSCs akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis kadar MMP-3 dan IL-6. Penelitian lainnya melaporkan bahwa HMSCs 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).²⁹ Sedangkan penelitian yang akan dilakukan ini berbeda dengan penelitian tersebut dimana HMSCs akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis kadar MMP-3 dan IL-6. Pemberian HMSCs meningkatkan produksi collagen A1, dan mencegah degradasi ekstra seluler matriks.³⁰ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana HMSCs akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis kadar MMP-3 dan IL-6. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa HMSCS menghambat aktivasi *Extra Cellular Matrix* (ECM)/MMP sehingga terjadi sintesis kolagen.³¹

Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana HMSCs akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis kadar MMP-3 dan IL-6. Penelitian lainnya juga melaporkan bahwa HMSCs mencegah diferensiasi myofibroblas dan pembentukan ECM yang dapat menyebabkan turunnya produksi kolagen. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana HMSCs akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis kadar MMP-3 dan IL-6. Penelitian oleh Utami et al melaporkan secretom MSCs hipoksia menghambat stress oksidatif pada DMT1 melalui peningkatan SOD dan penekanan sitokin proinflamasi IL-6.⁸ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana HMSCs akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis kadar MMP-3 dan IL-6.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Matriks Metaloproteinase-3

2.1.1. Definisi MMP-3

Matrix metalloproteinases (MMPs) adalah endopeptidase yang mengandung zinc dengan berbagai spesifisitas substrat dan terikat dengan membran yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi berbagai komponen protein *extracellular matrix* (ECM)^{30,31,32}. Struktur dan spesifisitas substrat MMPs dapat dikategorikan ke dalam lima subkelompok utama, yaitu (1) kolagenase (MMP-1, MMP-8 dan MMP-13); (2) gelatinase (MMP-2 dan MMP-9); (3) stromelisin (MMP-3, MMP-10 dan MMP-11); (4) matrilisin (MMP-7 dan MMP-26); dan (5) MMP tipe membran (MT) (MMP-14, MMP-15, dan MMP-16)³³. Endopeptidase ini disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dermal sebagai respons terhadap berbagai rangsangan seperti stres oksidatif, radiasi *ultraviolet*, dan sitokin³⁴.

MMPs terdiri dari 28 jenis yang berbeda telah diidentifikasi dan memainkan peran penting dalam berbagai proses patofisiologis termasuk penyembuhan luka, pertumbuhan tulang dan *remodelling*, arthritis, inflamasi, angiogenesis, kanker, dan *photoaging*^{30,35,36}. Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa radiasi UV meningkatkan setidaknya tiga MMPs yang berbeda pada kulit manusia secara *in vivo*, yaitu *interstitial collagenase* (MMP-1), *stromelysin-1* (MMP-3), dan 92 -kD

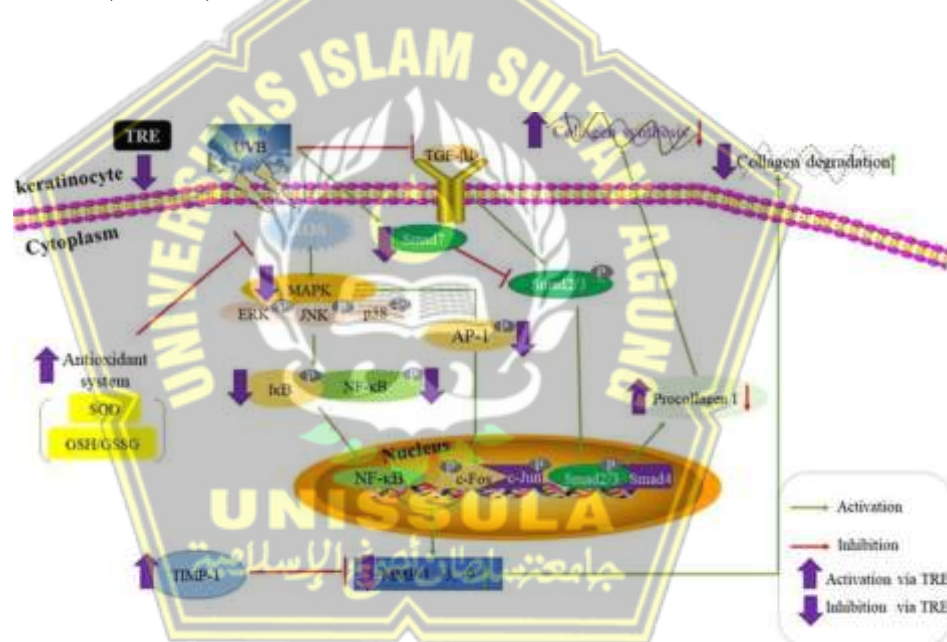
gelatinase (MMP-9)^{37,38,39}. MMP-1, MMP-3, and MMP-9 diatur secara kuat oleh faktor transkripsi *activator protein-1* (AP-1), yang secara cepat diinduksi dan diaktifkan oleh radiasi UV pada kulit manusia secara *in vivo* serta memiliki kapasitas untuk mendegradasi sebagian besar protein yang menyusun ECM dermal^{40,41,42}.

2.1.2. Peran dan Mekanisme Seluler MMP-3 dalam Kolagen Loss

Kolagen loss merupakan penurunan kadar kolagen pada kulit yang disebabkan oleh paparan UVA dan UVB yang dapat menginduksi stres oksidatif pada kulit manusia dan menyebabkan kerusakan genetik temporal dan persisten, peningkatan regulasi aktivitas *activator protein* (AP)-1, dan peningkatan ekspresi MMP^{43–46}. Proses penurunan kadar kolagen, *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler berlebih yang diinduksi UV mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) dan *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) yang berpuncak pada regulasi transkripsi MMP, dan menghasilkan degradasi kolagen dan elastin, yang berlanjut ke *photoaging* (Gambar 2.1).

MMPs yang diekspresikan pada kulit manusia normal, hanya tiga yang diinduksi secara signifikan sebagai respons terhadap penyinaran *ultraviolet* (UV), yaitu MMP-1 (kolagenase), MMP-3 (stromelysin-1), dan MMP-9 (92kD gelatinase). Pada kulit, keratinosit epidermis dan fibroblas dermal mensekresi kolagenase MMP-1 yang mendegradasi kolagen fibrilar tipe I dan III menjadi fragmen-fragmen spesifik di dalam triple heliks sentral. Gelatinase MMP-9 kemudian menghidrolisis fragmen ini

yang pada akhirnya merusak fungsi dermis kaya kolagen^{33,35,47}. Iradiasi UV menginduksi peningkatan sintesis dan ekspresi gen MMP-1 oleh fibroblast dermal, yang dirangsang oleh pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) berlebih, dan memainkan peran penting dalam penurunan kolagen. Iradiasi UV menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) yang mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)⁴⁸.



Gambar 2.1. Peran MMPs dalam Proses Penurunan Kadar Kolagen³³

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) adalah keluarga dari kinase Ser/Thr yang diarahkan oleh prolin yang terdiri dari *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) yang menstimulasi ekspresi c-Fos, p38 dan c-Jun *NH₂-terminal kinase* (JNK) yang menstimulasi ekspresi c-Jun³³. Kombinasi c-Jun dengan c-Fos membentuk faktor transkripsi AP-1 yang

memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 dan mengakibatkan degradasi kolagen^{32,48}. Ekspresi AP-1 dapat menghambat *transforming growth factor-β* (TGF-β) yang merupakan pengatur utama produksi prokolagen tipe I pada kulit manusia sehingga menyebabkan penurunan sintesis prokolagen^{49,50}. ROS juga terbukti menginduksi aktivasi transkripsi yang dimediasi NF-κB dan regulasi ekspresi gen MMP. Aktivitas NF-κB bertanggung jawab atas up-regulasi MMP-1 dan MMP-3 pada fibroblas dermal^{51,52}. Aktivasi AP-1 yang diinduksi UV meningkatkan ekspresi gen MMP-1, MMP-3, dan MMP-9. Ketiga MMP tersebut mendegradasi sejumlah besar protein ECM, seperti kolagen tipe IV, V, IX, dan X, gelatin, fibrillin-1, fibronectin, laminin, dan proteoglikan. Fungsi utama MMP-3 adalah mengaktivasi pro-MMP seperti kolagenase, gelatinase B, dan matrilisin selama pergantian ECM. Produksi MMP-1 dan MMP-3 sangat penting untuk mengaktifkan sebagian pro-MMP-1^{36,53}.

2.2. Interleukin-6

2.2.1. Definisi IL-6

IL-6 adalah interleukin yang bertindak sebagai sitokin pro-inflamasi dan miokin anti-inflamasi. Osteoblas mensekresi IL-6 untuk merangsang pembentukan osteoklas. Sel otot polos di tunika media banyak pembuluh darah juga memproduksi IL-6 sebagai sitokin pro-inflamasi. Peran IL-6

sebagai miokin anti-inflamasi dimediasi melalui efek penghambatannya pada TNF-alpha dan IL-1 dan aktivasi IL-1ra dan IL-10⁵⁷.

2.2.2. Peran IL-6 pada penurunan kolagen

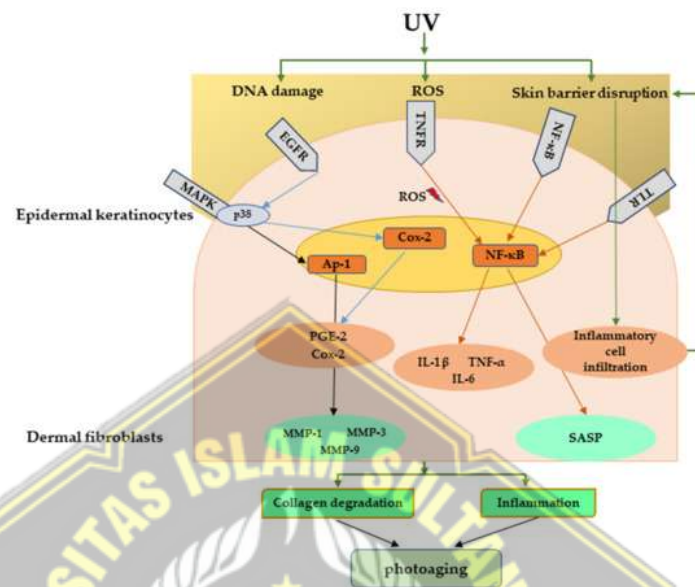
Konsentrasi IL-6 meningkat selama degradasi kolagen, dan tidak tergantung pada etnis. Konsentrasi IL-6 yang cukup tinggi pada orang tua memainkan peran penting dalam gangguan fungsional, termasuk gerak rendah, fungsi kognitif dan mental, dan depresi. Tingkat yang sangat tinggi dari sitokin ini bahkan dapat memprediksi peningkatan kematian pada individu yang sangat tua. Di sisi lain, tingkat IL-6 yang rendah mewakili "inflamasi" yang lebih rendah⁵⁸.

Penurunan kadar kolagen adalah suatu kondisi yang memungkinkan atau menyebabkan munculnya beberapa penyakit yang terkait kolagen. Fibroblast yang mengalami abnormalitas menunjukkan kemiripan dengan *cancer associated fibroblast* (CAFs), termasuk memiliki ekspresi mRNA IL-6 yang tinggi. Profil transkripsi fibroblas dermal wajah pada anak-anak, dan orang dewasa yang sehat, fibroblas dermal yang rusak akibat UVB pada pasien yang menderita karsinoma sel basal, dan CAF pada karsinoma sel skuamosa basal memiliki kesamaan dalam ekspresi pensinyalan IL-6. Janus kinase 2 (JAK2) transduser sinyal dan aktivator transkripsi 3 (STAT3) menunjukkan tren peningkatan yang jelas dari aktivitas yang sangat rendah pada fibroblas, hingga aktivitas pada fibroblas dermal dalam memproduksi produksi kolagen berkaitan dengan peningkatan derajat inflamasi⁵⁷.

Paparan UVB pada kulit dapat menghasilkan peningkatan jumlah ROS yang menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dan mekanisme pertahanan antioksidan, yang mengakibatkan stres oksidatif⁵⁹. Stres oksidatif ini dapat meningkatkan produksi ROS, dan dapat memulai peradangan dengan mengaktifasi sitokin pro-inflamasi, seperti interleukin-2 (IL-2), IL-6, dan TNF- α , melibatkan beberapa jalur NF- κ B, *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf-2), dan *activator protein 1* (AP-1)^{58,60}. Sirtuins, suatu histone deacetylase yang bergantung pada nikotinamida adenin dinukleotida (NAD(+)), juga mendapat perhatian karena kemampuannya untuk menunda penuaan seluler dan mendorong perbaikan kerusakan DNA. SIRT1 terbukti memiliki efek anti-inflamasi dengan menghambat pensinyalan NF- κ B. UVB juga dapat menyebabkan peradangan kronis dengan menurunkan regulasi ekspresi SIRT1 pada keratinosit manusia⁶¹.

Berbagai stresor termasuk radiasi UV dapat mengaktifkan respon kerusakan DNA yang dapat memulai penghentian siklus sel melalui jalur p53/p21 yang melibatkan kaskade P38/MAPK dan jalur NF- κ B. Kulit manusia yang terpapar sinar UV memiliki akumulasi sel-sel tua yang sangat tinggi. Akumulasi fibroblas tua dapat mempercepat penuaan kulit dengan mensekresi faktor-faktor fenotipe sekretori terkait penuaan (SASP), termasuk IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, dan MMPs. Faktor SASP yang disekresikan dari fibroblas tua bertanggung jawab atas peradangan kronis serta degradasi ECM. Gambar 2.2 menjelaskan jalur pensinyalan utama

yang terlibat dalam penurunan kolagen hingga photoaging yang diperantarai UV^{62,63}.



Gambar 2.2. Jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam hiperpigmentasi yang dimediasi UV akibat aktivasi reseptor inflamasi⁶³

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 pusat⁶⁴. Secara umum, MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotipe, 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 ⁶⁵.

2.3.2. Sumber MSCs

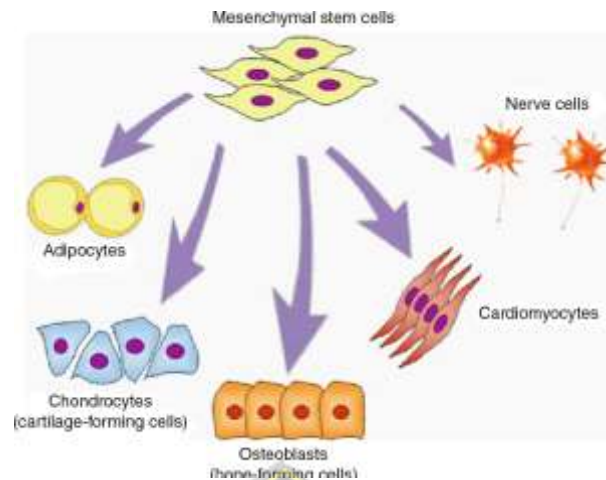
MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta ⁶⁴.



Gambar 2.3. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs) ⁶⁶

2.3.3. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit ⁶⁷. Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekspresi beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit ⁶⁸.



Gambar 2.4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁶⁹

2.3.4. Peran MSCs

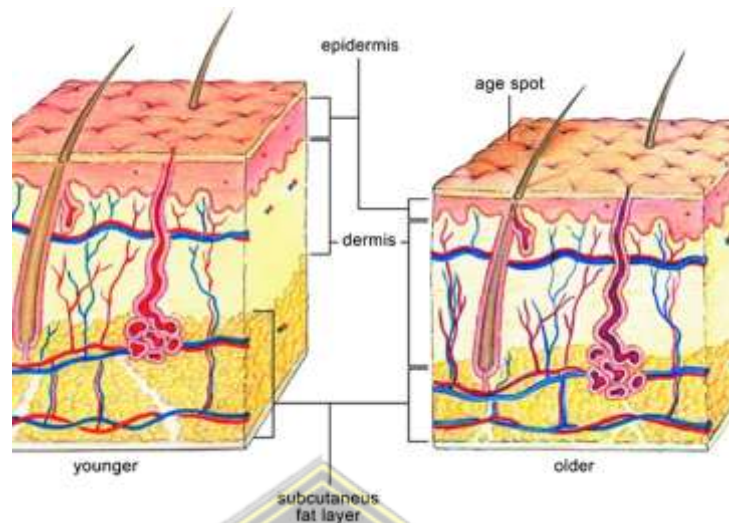
Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk bersifat pro-inflamasi atau bersifat anti-inflamasi. MSCs 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 bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengeksresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi ^{70,71}.

2.4. Kolagen

2.4.1. Definisi Kolagen

Kolagen Merupakan protein (polipeptida) ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe kolagen, jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia ⁷².

Kolagen-1 merupakan jenis serabut kolagen terbanyak yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit. Serabut kolagen-1 berperan penting dalam pembentukan jaringan parut. Kolagen-2, kolagen-9, kolagen-10, kolagen-11 ditemukan pada kartilago. Kolagen-3 banyak dijumpai pada kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. Kolagen-3 penyebarannya hampir sama dengan kolagen-1. Sedangkan kolagen-7 kebanyakan lokasinya terletak pada *anchoring fibril* di *dermal epidermal junction* pada kulit, mukosa dan servik. Kolagen-7 juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah ⁷³.



Gambar 2.5. Perbedaan Kolagen Pada Kulit Muda dan Kulit Tua. Jumlah Kolagen pada kulit yang lebih muda lebih banyak dibandingkan kulit yang lebih tua ⁷⁴.

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

Pada umumnya jumlah kolagen akan berkurang dengan bertambah umur. Akan tetapi beberapa tipe kolagen mengalami hal yang tidak sama. Pada kulit anak mempunyai banyak kolagen-3 (biasanya pada jaringan dengan pertumbuhan cepat). Pada proses penuaan intrinsik akan terjadi penurunan kolagen-3 dan peningkatan kolagen-1. Kolagen-1 terus

meningkat sampai umur 35 tahun, saat kulit mencapai puncak kekuatan mekanik, setelah itu kolagen-1 akan menurun. Hubungan umur dengan jumlah kolagen sampai saat ini belum jelas, akan tetapi jumlah kolagen manusia setelah umur 60 tahun secara keseluruhan secara signifikan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kulit umur lebih muda⁷³.

Kolagen 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 kolagen merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Diperkirakan bahwa akan terjadi penurunan kolagen sekitar 1% pertahun perunit area kulit akan tetapi pada kulit yang terpapar sinar UVB dijumpai penurunan sampai 59% seperti yang ditemukan pada kulit yang mengalami *photodamage*⁷².

Walaupun kolagen-1 merupakan kolagen utama pada lapisan dermis kulit akan tetapi kolagen tipe lain juga tidak kalah peranan pentingnya. Kolagen-7 yang terbanyak pada *anchoring fibril* terletak pada membrana basalis yang melekatkan membrana basalis ke papila dermis. Pada pasien dengan paparan sinar UVB kronis akan menurunkan jumlah kolagen-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 kolagen-7 pada dasar kerutan kulit di samping juga ditemukan penurunan kolagen-4 pada tempat yang sama ⁷⁵.

2.4.2. Perubahan pada kolagen

Pada kulit yang mengalami *Photoaging*, serat kolagen mengalami disorganisasi. Serabut kolagen dan kumpulan serat kolagen berkurang serta mengalami homogenisasi. Kulit yang mengalami *Photoaging* prekursor kolagen Tipe I dan III dan *crosslink*-nya berkurang ⁷⁶. Dengan menggunakan antibody terhadap kolagen Tipe I, tidak ditemukan ada perubahan kolagen setelah radiasi UVB-B selama 10 minggu. Peningkatan kolagen pada Tipe III dimulai setelah terpapar UVB-B selama 12 minggu (5 hari perminggu dengan ½ MED setiap pemaparan).

Kolagen dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik meliputi sinar ultraviolet, polusi, dan diet. Faktor ekstrinsik dapat memperberat kerusakan kolagen yang disebabkan oleh faktor intrinsik. Pengaruh faktor genetika tampak pada studi penuaan kulit pada berbagai etnis. Etnis dengan pigmentasi lebih gelap, seperti ras Afrika-Amerika, memiliki daya perlindungan yang lebih tinggi terhadap Ultraviolet. Sinar Ultraviolet memicu pembentukan radikal bebas sehingga merusak kolagen kulit. Kulit ras Afrika - Amerika mengandung lipid interseluler lebih banyak daripada ras Kaukasia sehingga lebih resisten terhadap penuaan. Kerutan wajah pada ras Asia terjadi lebih lambat dan lebih ringan daripada ras Kaukasia ⁷⁴.

Penurunan kolagen kulit tampak signifikan pada wanita menopause. Kolagen kulit orang dewasa berkurang 1 % setiap tahun. Penurunan kolagen ini lebih tampak pada wanita daripada pria. Kulit kendur dan kerutan wajah disebabkan kerusakan akumulasi kolagen. Sinar ultraviolet juga memicu pembentukan radikal bebas, yang dapat bereaksi dengan protein seperti kolagen sehingga terjadi kerusakan kolagen⁷⁷.

2.4.3. Mekanisme kerusakan kolagen

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast yang menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast kulit yang mengalami kerusakan akibat Ultraviolet. Pada kulit yang terlindungi sinar matahari dengan kolagen Tipe I yang terdegradasi sebagian diperoleh melalui percobaan *in-vitro* kolagen yang dicampur dengan MMPs yang diinduksi oleh sinar Ultraviolet, yang terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu; mekanisme secara langsung terjadi degradasi kolagen secara tidak langsung melalui hambatan sintesis kolagen oleh degradasi kolagen yang terbentuk dari MMP. Kolagen Tipe I yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya⁷⁸. Model yang menggambarkan kerusakan akibat paparan sinar UVB pada jaringan kulit. Paparan ultraviolet (panah bergerigi) mengaktifkan faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin pada permukaan keratinosit dan fibroblast. Reseptor aktif menstimulasi jalur sinyal transduksi dan merangsang faktor transkripsi AP-1, yang mempengaruhi transkripsi gen MMP. Dalam fibroblas, AP-1 juga menghambat ekspresi gen prokolagen. MMP disekresikan oleh keratinosit

dan fibroblas dan memecah kolagen dan protein lain yang terdapat pada matriks ekstraselular dermis. Perbaikan kerusakan kulit yang tidak sempurna akan mengganggu integritas fungsional dan struktural dari matriks ekstraseluler. Paparan sinar matahari berulang menyebabkan akumulasi kerusakan kolagen yang akhirnya menghasilkan kerutan yang spesifik (*photodamage skin*)^{79,80}.

2.4.4. Sintesis Kolagen

Awal polipeptida dibentuk di dalam ribosom dari retikulum endoplasma kasar yang disebut rantai prokolagen 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 kolagen dihidroksilasi setelah proses translasi menjadi bentuk hidroksiprolin dan hidroksilisin⁸¹.

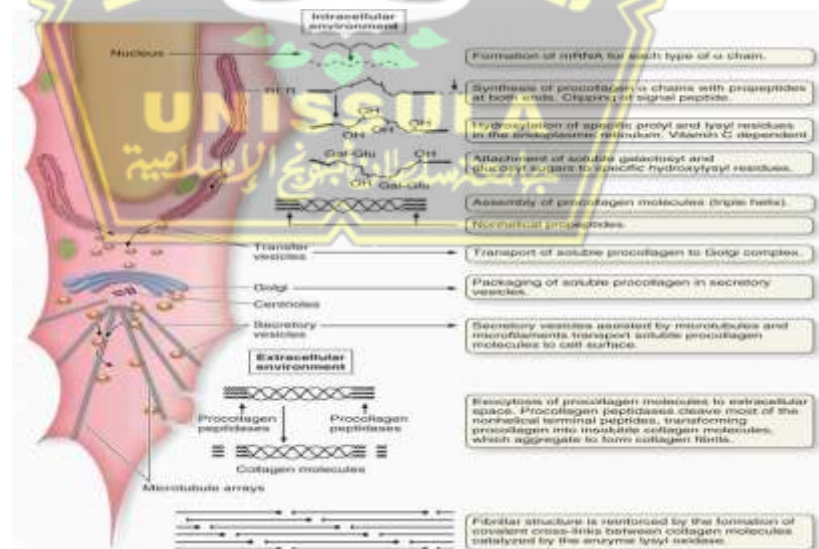
2.4.5. Sintesis Prokolagen

Bentuk *triple helix* dari rantai α berbetnuk molekul prokolagen seperti sebuah batang, dimana kolagen tipe 1 dan 2 berukuran panjang, 300nm dan lebar 1,5nm. Molekul prokolagen mungkin homotrimerik, dimana ketiga rantainya identik, atau heterotrimerik, dimana dua atau ketiga rantainya memiliki sekuen yang berbeda. Kombinasi dari banyak rantai prokolagen α sangat bertanggungjawab atas bermacam-macam tipe dari kolagen dengan struktur dan fungsi yang berbeda. Pada kolagen tipe I, II, III, molekul kolagen bersatu dan menjadi berkelompok bersama-sama membentuk fibril⁸².

Karena kolagen tipe I sangat banyak, maka didapatkan banyak penelitian tentang sintesis kolagen ini. Sintesis dari protein penting ini meliputi beberapa tingkat, dimana disimpulkan pada gambar 2.3⁸³:

1. lipetida rantai prokolagen α diproduksi pada ikatan poliribosom yang berikatan dengan membrane dari Retikulum 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 ribosom. Enzim yang menyertai adalah prolil hidroxilase dan lisil hidroxilase dan reaksi yang membutuhkan O_2 , Fe^{2+} dan asam askorbat (vitamin C) sebagai kofaktor.
3. Terjadi glikosilasi pada beberapa sisa hidroksilisin, dengan bermacam-macam tipe dari kolagen 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 prokolagen soluble dan mencegah pembentukan intraseluler prematur dan pengendapan dari fibril kolagen. Prokolagen ditranspotasikan melalui jaringan golgi dan dieksositosis ke lingkungan ekstraselular.

5. Diluar sel, protease spesifik disebut peptidase prokolagen menyingkirkan perpanjangan propeptida, perubahan dari molekul prokolagen menjadi molekul kolagen. Sekarang ini sesuai untuk pembentukan sendiri kedalam fibril kolagen polimerik, biasanya pada tempat tertentu dekat dengan permukaan sel.
6. Pada beberapa tipe kolagen, *fibril* berkumpul membentuk *fiber*. Proteoglikan tertentu dan tipe kolagen (tipe V dan tipe XI) bergabung pada kumpulan molekul kolagen 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 kolagen, sebuah proses dikatalisis oleh enzim lisil oksidase.



Gambar 2.6. Sintesis Kolagen⁸⁴

Proses Hidrosilasi dan glikosilasi pada rantai α prokolagen dan pembentukan menjadi *triple helices* terjadi pada RER (*Rough Endoplasmic Reticulum*) dan pembentukan menjadi fibril terjadi pada *Extracellular Matrix* sesudah mengekskresikan prokolagen. Karena ada sedikit perbedaan pada gen rantai α prokolagen dan produksi kolagen tergantung pada beberapa kejadian setelah translasi meliputi beberapa enzim lainnya, banyaknya penyakit kegagalan sintesa kolagen yang telah dijelaskan⁸⁵.



Gambar 2.7. Procollagen⁸⁴

Bentuk dari kolagen yang paling banyak, tipe 1, setiap molekul prokolagen terdiri dari dua rantai peptide yaitu α_1 dan α_2 . Massa 1 buah molecular 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 tropokolagen adalah 300nm dan lebarnya 1,5 nm⁸⁴.

2.5. Pengaruh HMSCs terhadap Kadar MMP-3 dan IL-6 pada tikus wistar yang dipapar sinar UVB

HMSCs dapat menginduksi sekresi mediator-mediator dan *growth factor* yang mendukung regenerasi kulit, antara lain seperti sitokin antiinflamasi (IL-10), vascular endothelial growth factor (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF), tumor

necrosis factor alfa (TNF- α), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF β 1), angiopoietin, IL-1, IL-6, dan IFN γ yang akan mencegah hiperpigmentasi^{86,87}. Irradiasi UVB menginduksi pembentuk ROS oleh mitokondria akibat stress oksidatif⁵⁹. ROS mengaktifasi jalur NF- κ B disitoplasma melalui berbagai mekanisme. ROS mengaktifasi NF- κ B melalui fosforilasi I κ B α sehingga mengakibatkan degradasi I κ B α sehingga NF- κ B dapat masuk kedalam nucleus untuk mengaktifkan transkripsi⁸⁸. ROS juga dapat mempengaruhi sifat pengikatan DNA dari protein NF- κ B itu sendiri⁸⁹.

NF- κ B yang aktif akan bertranslokasi ke nukleus dan menginduksi transkripsi target seperti IL-6, IL-1 β , IL-8 dan TNF- α ⁹⁰. IL-6 yg aktif akan berikatan dengan reseptor CD126 sehingga mengaktifkan jalur STAT3 yang menginduksi aktivasi NF- κ B untuk transkripsi sitokin inflamasi kembali⁹¹. Peningkatan ekspresi sitokin inflamasi ini menginduksi degradasi kolagen melalui ekspresi MMP-3 dan menyebabkan terbentuknya *wrinkle*⁹². Sitokin IL-10 yang diinduksi HMSCs dapat mencegah secara langsung produksi ekspresi ROS⁹³. IL-10 mengaktifasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentranslokasi kedalam nucleus untuk mengdiring ekspresi gen responsive STAT3, antara lain *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). Melalui sintesis SOCS3 de novo, IL-10 dapat menghambat ekspresi sejumlah gen proinflamasi termasuk gen sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ . SOCS3 juga menghambat aktivasi MAPK dan translokasi NF- κ B kedalam nucleus sehingga tidak terjadi

ekspresi gen proinflamasi⁹⁴. Kandungan lain dari HMSCs adalah TGF- β yang terbukti secara signifikan mengaktifasi fosforilasi SMAD2/3 untuk masuk ke nucleus dan menginduksi ekspresi sitokin antiinflamasi⁹⁵. Maka dengan adanya HMSCs, merupakan kandidat yang mampu mencegah terjadinya kolagen loss dengan menurunkan kadar IL-6 dan MMP-3.



BAB III

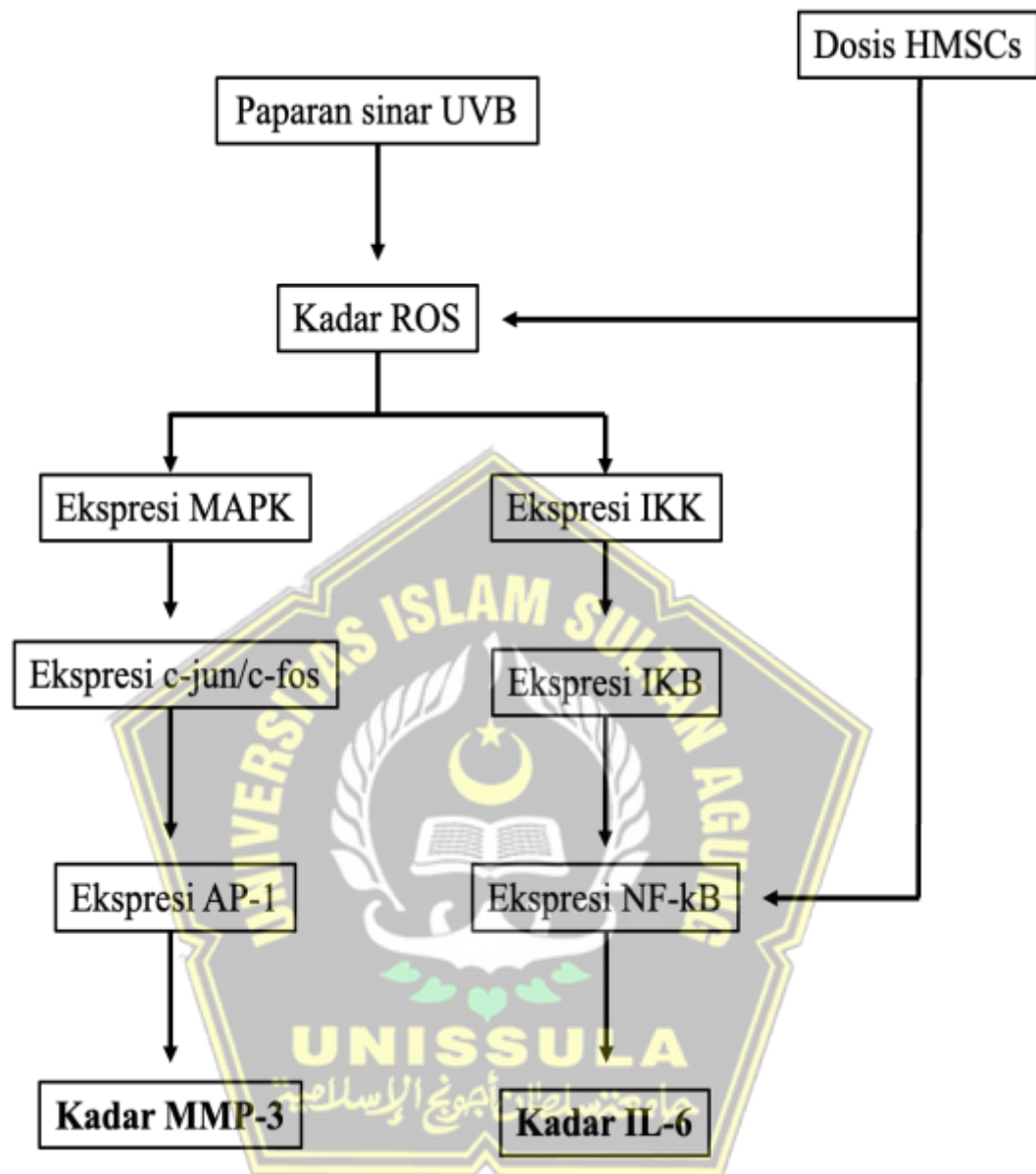
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB dari sinar matahari menginduksi peningkatan produksi ROS yang kemudian akan mengaktifasi MAPK Pathway. Aktivasi MAPK akan mengaktifasi akan merangsang ekspresi ERK untuk menginduksi c-Fos. Disisi lain MAPK juga mengaktifasi p38 dan JNK untuk meningkatkan ekspresi c-Jun. Kompleks c-Jun dan c-Fos akhirnya membentuk faktor transkripsi AP-1⁹⁶. AP-1 selanjutnya mengaktifasi faktor transkripsi MMPs antara lain MMP-3, aktivasi ini akan memecah ECM sehingga terjadi degradasi kolagen⁹⁷. Ekspresi ROS menginduksi aktivasi transkripsional yang dimediasi NF- κ B dan meregulasi ekspresi gen MMP-1 di fibroblast kulit⁹⁸. Peningkatan kadar ROS juga akan mengaktifasi fosforilasi IKK sehingga akan mengaktifasi translokasi NF- κ B ke nukleus untuk menginduksi transkripsi sitokin proinflamasi IL-6. Disisi lain ROS juga mengaktifasi jalur JNK yang akan mengaktifkan AP-1 yang juga menginduksi inflamasi dengan terbentuknya IL-6.

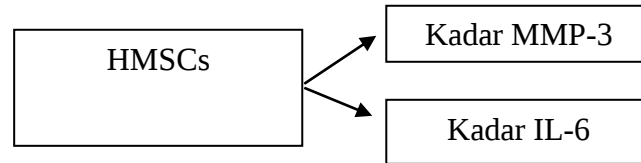
Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal⁶⁷. Sitokin-sitokin dan mediator-mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10, TGF β , TGF α , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF,

GM-SCF, TNF, IGF-1, dan HGF. Pada penelitian ini HMSCs diberikan secara subkutan dengan pada daerah yang mengalami kolagen loss dari hasil induksi iradiasi UVB. Aktivitas HMSCs akan turut mencegah produksi ROS akibat peran IL-10, inaktivasi jalur ERK/MAPK akibat peran TGF-B sehingga akan mencegah MMP-3 yang menginduksi procollagen dan menginduksi SOD akibat peran IL-10 sehingga sehingga degradasi kolagen tidak terjadi⁹⁹. HMSCs dapat mencegah aktivasi NF-kB sehingga dapat mencegah transkripsi sitokin IL-6. Kondisi hipoksia pada MSCs akan mentrigger HIF-1 yang merupakan faktor transkripsi yang menjadi stabil dan aktif dalam kondisi hipoksia¹⁰⁰. Aktivasi HIF-1 pada MSCs meningkatkan kemampuan proliferasi, kelangsungan hidup, dan diferensiasi MSCs yang penting untuk regenerasi dan perbaikan jaringan melalui peningkatan produksi faktor parakrin dan ekstra seluler vesikel. Faktor-faktor ini termasuk molekul anti-inflamasi IL-10 yang membantu mengurangi peradangan dengan menekan sitokin pro inflammasi IL-6⁹⁹. MSCs dalam kondisi hipoksia dapat memodulasi ECM, yang penting untuk menjaga struktur dan fungsi jaringan. Dengan mempengaruhi komponen ECM seperti mencegah produksi enzim MMP-3, MSCs membantu mencegah degradasi kolagen dan mendukung integritas jaringan¹⁰¹.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah pemberian HMSCs berpengaruh terhadap kadar MMP-3 dan kadar IL-6 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B.

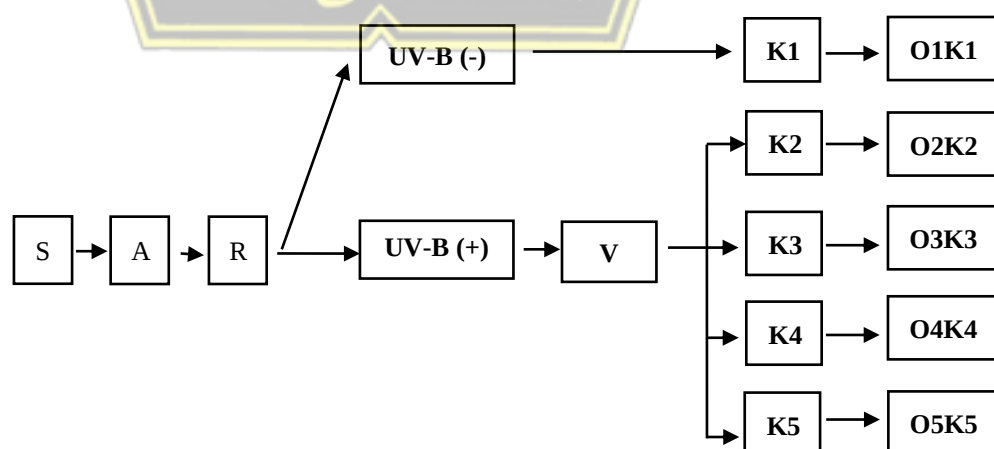


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah Tikus jantan Galur Wistar dengan bobot badan 200-250 gr. Perlakuan terdiri dari kelompok K1 yaitu tikus sehat tanpa penyinaran UV-B), kelompok K2 yaitu kelompok kontrol negatif dimana tikus dipapar UV-B dengan pemberian vehicle NaCl secara subkutan, kelompok K3 yaitu kelompok kontrol positif dimana Tikus dipapar UV-B dengan pemberian kontrol positif hyaluronic acid (HA) Staris® dosis 200uL secara subkutan, kelompok K4 yaitu kelompok perlakuan 1 dimana tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HMSCs $2,5 \times 10^5$ sel secara subkutan, dan kelompok K5 yaitu kelompok perlakuan dua dimana tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HMSCs 5×10^5 sel secara subkutan.



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Sampel

A : Aklimasi

R : Randomisasi menjadi 4 kelompok

O1K1 : Observasi Kelompok 1

O2K2 : Observasi Kelompok 2

O3K3 : Observasi Kelompok 3

O4K4 : Observasi Kelompok 4

O4K5 : Observasi Kelompok 5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel secara subkutan

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat: Kadar MMP-3 dan Kadar IL-6

4.2.1.3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah sinar UVB.

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. HMSCs

HMSC adalah stem cells yang memiliki bentuk menyerupai sel fibroblas (*fibroblast-shaped*) yang pada penelitian ini diisolasi dari tikus galur Wistar pada 19 hari masa bunting dan dikultur menggunakan medium DMEM yang dicampur dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS), antijamur dan antibiotik. MSCs passage 4 digunakan untuk penelitian dengan di induksi hipoksia dengan O₂ 5% selama 24 jam lalu di panen dan dilakukan validasi MSCs dengan flowcytometry menggunakan parameter stemness marker dengan nilai persentase CD29+, CD4+ dan negatif marker CD45- dan CD31-. Dosis HMSCs yang digunakan sebanyak $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel untuk masing-masing kelompok perlakuan diinjeksikan pada hari ke 15.

Skala: Rasio

4.2.2.2. Kadar MMP-3

MMP-3 adalah endopeptidase yang mengandung zinc dengan berbagai spesifisitas substrat dan terikat dengan membran yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi berbagai komponen protein *extracellular matrix*. Sampel jaringan kulit di isolasi pada hari ke-21 perlakuan dan di analisis kadar MMP-3. Banyaknya MMP-3 dalam plasma darah tikus yang dinyatakan dalam satuan ng/L, diukur menggunakan

metode ELISA dengan reagen ELISA kit rat MMP-3 di Laboratorium SCCR Indonesia.

Skala: Rasio

4.2.2.3.Kadar IL-6

IL-6 adalah sitokin proinflamasi yang memiliki peran dalam proses degradasi kolagen akibat irradiasi UVB. Sampel jaringan kulit di isolasi pada hari ke-21 perlakuan dan di analisis kadar IL-6. Banyaknya IL-6 dalam plasma darah tikus yang dinyatakan dalam satuan ng/L, diukur menggunakan metode ELISA dengan reagen ELISA kit rat IL-6 di Laboratorium SCCR Indonesia

Skala : Rasio

4.2.2.4. Sinar UVB

Dalam penelitian ini, sinar UVB merujuk kepada radiasi UVB yang dihasilkan oleh perangkat UVB narrowband tipe TLF72-100W/12. Paparan sinar UVB dilakukan selama 5 kali perminggu pada hari ke 1, 2, 4, 5, dan 7 selama 2 minggu. Dosis paparan sinar UVB dengan UV *light* (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari dengan jarak 20cm.¹⁰²

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang diperoleh dari SCCR Indonesia yang dipapar sinar UV-B 302 nm dengan MED 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit dengan jarak 20 cm selama 5 kali seminggu selama 2 minggu hingga berkurangnya densitas kolagen.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tikus putih jantan Galur Wistar yang mengalami *collagen loss* akibat paparan UV-B.
2. Umur 2-3 bulan.
3. Kondisi sehat.
4. Berat badan 200-250 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan Galur Wistar dengan kriteria :

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tidak mengalami *collagen loss*.

4.3.2.3. Kriteria Drop Out

Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan Galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok Sham (tikus sehat tanpa paparan UV-B), Kontrol Negatif (tikus dipapar UV-B dengan pemberian NaCl 0.9% secara subkutan), Kontrol positif (tikus dipapar UV-B dengan pemberian HA dosis 200uL sevara subkutan) Perlakuan 1 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel secara subkutan) dan Perlakuan 2 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan HMSCs dosis 5×10^5 sel secara subkutan)

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 5 ekor tikus perkelompok dan di tambahkan 1 hewan uji perkelompok sebagai cadangan.

Keterangan:

t= banyaknya perlakuan

n= banyak sampel setiap perlakuan

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa *UV light* (broadband dengan *peak emission* pada 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm², pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah *vacutainer*, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm *biopsy punch*, sentrifus, mikropipet, 1000 uL mikropipet tip, dan *vial tube* 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain *microplate reader*, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

4.4.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan yang terdiri :

- seperti *gel base*,

- ketamin,
- *xylazine*,
- etanol,
- akuades,
- kloroform,
- Elisa kit MMP-3
- Elisa kit IL-6

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Prosedur Isolasi Hypoxia Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

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

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

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

4.5.3. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow Cytometry*^{103,104}

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BDTM accutaseTM *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 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 flowcytometry (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
	hMSC positive cocktail	20 μ l
7	PE hMSC negative cocktail	20 μ l

4.5.4. Pembuatan Hypoksia MSCs (HMSCs).

1. MSCs yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL. MSCs didalam flask kemudian di masukkan kedalam hipoksia chamber.
2. Gas nitrogen di salurkan melalui katub inlet dan O₂ meter di tempatkan di lubang sensor. Nitrogen di tambahkan hingga sensor menunjukan 5% O₂.
3. Chamber hipoksia kemudian di inkubasi selama 24 jam selama 37C.
4. Sel yang telah di hipoksia di panen dan di masukan dalam spuit 1 mL serta di tambahkan NaCl 0,9%.

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

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kg BB) dan xylazine (20mg/kg BB).
2. Rambut pada bagian punggung tikus di potong hingga bersih.
3. Punggung tikus dipapar dengan UV *light* (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari dengan jarak 20cm selama 5 kali seminggu (hari 1, 2, 4, 5, dan 7) selama 2 minggu¹⁰².
4. Tikus Perlakuan 1 kemudian diberi perlakuan secara subkutan menggunakan HMSCs yang diberikan satu kali pada hari 15 hari.

Tikus pada Perlakuan 2 diberi perlakuan secara subkutan menggunakan HMSCs yang diberikan satu kali pada hari 15 hari.

4.5.6. Pengambilan Sampel Darah

Sebanyak 3 mL sampel darah subjek penelitian diambil pada hari ke-21 dari vena orbital menggunakan tabung hematokrit tanpa pembiusan. Sampel darah dimasukkan ke dalam vacutainer EDTA dan didiamkan selama 10 menit, kemudian disentrifus pada kecepatan 400xG selama 10 menit. Kemudian diambil menggunakan micropipet, dimasukkan ke dalam tabung vial 1,5 mL dan disimpan pada suhu -80°C hingga proses analisis dilakukan.

4.5.7. Pembuatan Blok Parafin.

1. Dehidrasi

Masukan potongan jaringan dalam alkohol bertingkat dari 30%, 40%, 60%, 50%, 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. Masukkan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.8. Validasi Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan Kolagen

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

1. Slide jaringan dideparafinisasi.
2. Cairan Bouin dipanaskan pada suhu 54-64°C.
3. Slide diinkubasi dalam Cairan Bouin yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
4. Slide diinkubasi dalam Hematoxylin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian bilas dengan air.
5. Slide diinkubasi dalam larutan *Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin* selama 15 menit, kemudian dibilas dengan air.
6. Slide diinkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat selama 10-15 menit.
7. Slide diinkubasi dalam larutan *Aniline Blue* selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air.
12. Slide diinkubasi dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit.
13. Slide dilakukan proses dehidrasi, kemudian pasang *desk glass*.

4.5.9. Analisis Kuantitatif Kadar MMP-3 dan IL-6 dengan metode ELISA

Sampel plasma darah yang telah diperoleh kemudian dianalisis kadar MMP-3 dan IL-6 menggunakan metode *Enzyme Linked Immunoabsorbance Assay* (ELISA). Sebelum proses analisis, plasma darah dicairkan dalam suhu ruang dan diresuspensi untuk agar serum tercampur secara merata. Analisis ELISA MMP-3 dan IL-6 dilakukan dengan metode kit dari Finetest[®] (Wuhan, China). Langkah-langkah analisis kadar MMP-3 dan IL-6 mengikuti protocol yang sesuai dengan petunjuk ada. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 450 nm.

4.6. 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 September – Oktober 2024.

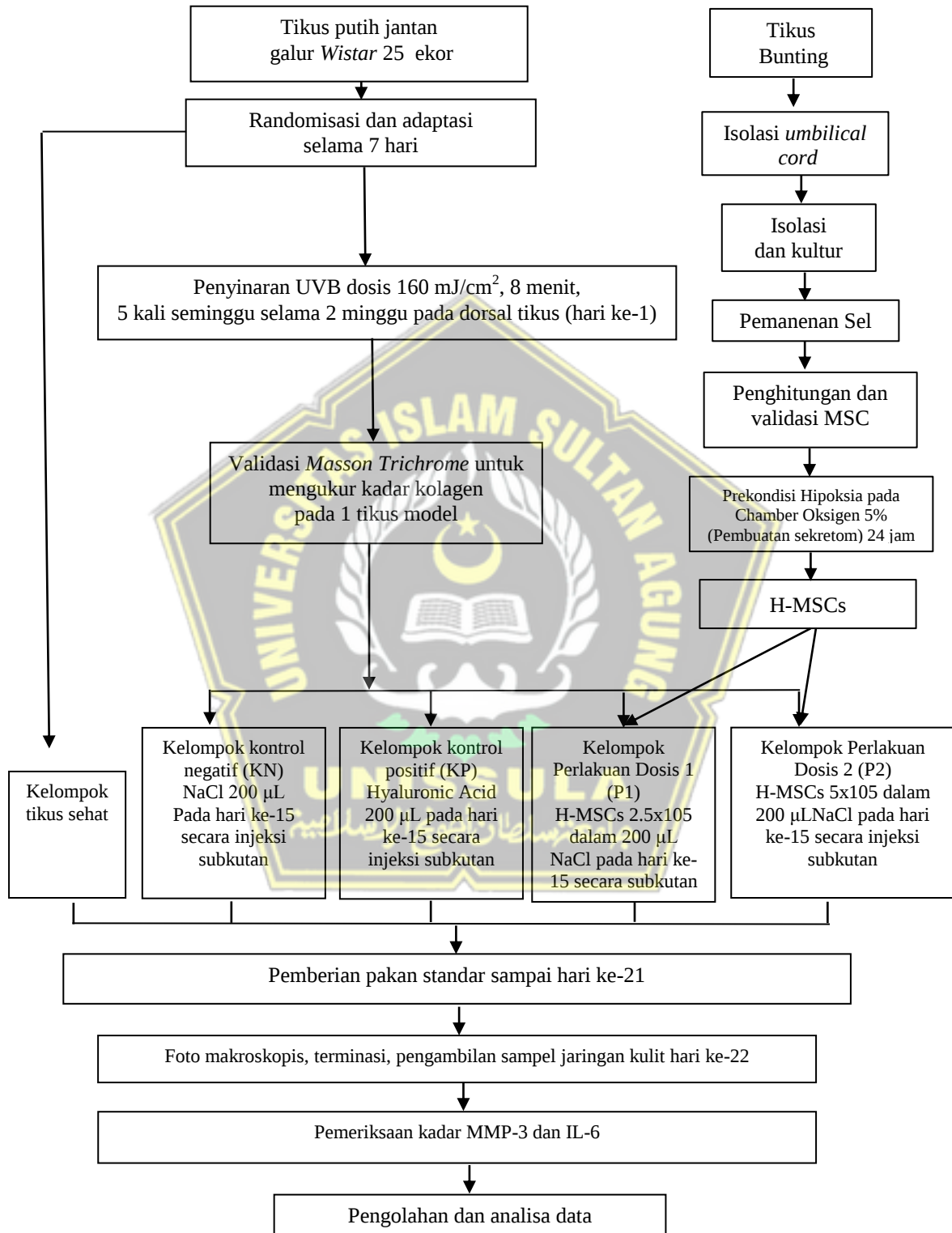
4.7. Analisa Data

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*. Pada penelitian ini diperoleh data IL-6 adalah normal dan homogen yang ditandai dengan ($P > 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Pada data MMP-3 diperoleh data normal dan tidak homogen, maka juga dilakukan uji beda *One Way Anova*. Data variabel IL-6 dan MMP-3

menunjukkan terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk IL-6 dan *post hoc Tamhane* untuk MMP-3 yang bertujuan 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*.



4.1. Alur Penelitian



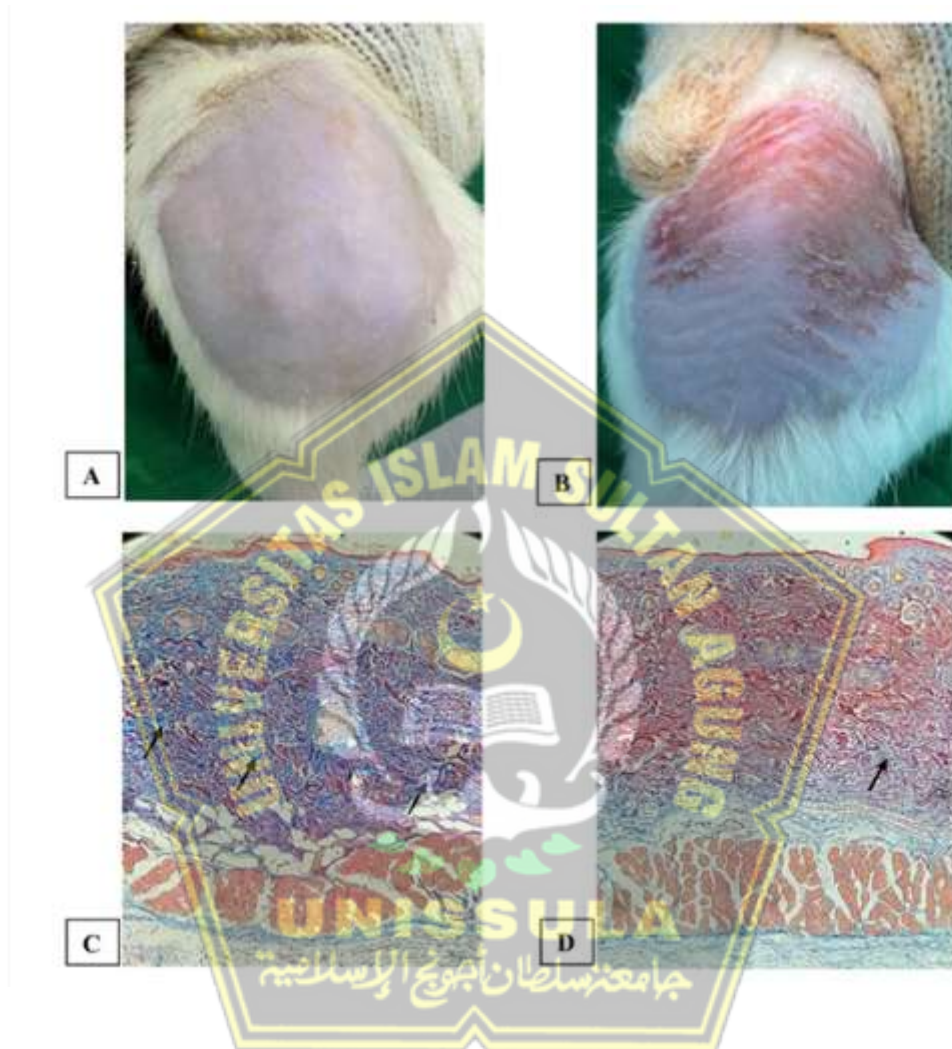
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Oktober hingga November 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan *collagen loss* yang di induksi UVB 302 nm dengan dosis 160 mJ/cm² selama 2 minggu. Penelitian ini menggunakan 25 ekor dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Pada penelitian ini di bagi menjadi 5 kelompok yaitu, kelompok sehat, kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan satu menerima suntikan hypoxia mesenchymal stem cells (HMSCs) $2,5 \times 10^5$ sel, dan kelompok perlakuan dua menerima suntikan HMSCs 5×10^5 sel secara subkutan pada hari ke 15 setelah penyinaran UVB. Pada penelitian ini, sebelum penelitian dilaksanakan dilakukan validasi *collagen loss* dan terbukti bahwa pemberian sinar UVB dengan dosis tersebut mampu menyebabkan *collagen loss*. Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa pemberian HMSCs dapat menurunkan kadar IL-6 dan MMP-3 secara signifikan.

Hasil pengamatan secara anatomis terlihat bahwa pada tikus yang mendapatkan paparan sinar UVB pada hari ke-15 pengamatan, kulit bagian dorsal terjadi kemerahan eritema dan kerutan jika dibandingkan kelompok sehat (Gambar 5.1 A-B). Pengamatan secara mikroskopis dengan pewarnaan *masson trichome* untuk mewarnain kolagen dilakukan pada hari ke 15 untuk melihat adanya *collagen loss* akibat paparan UVB. Hasil pengamatan terlihat adanya

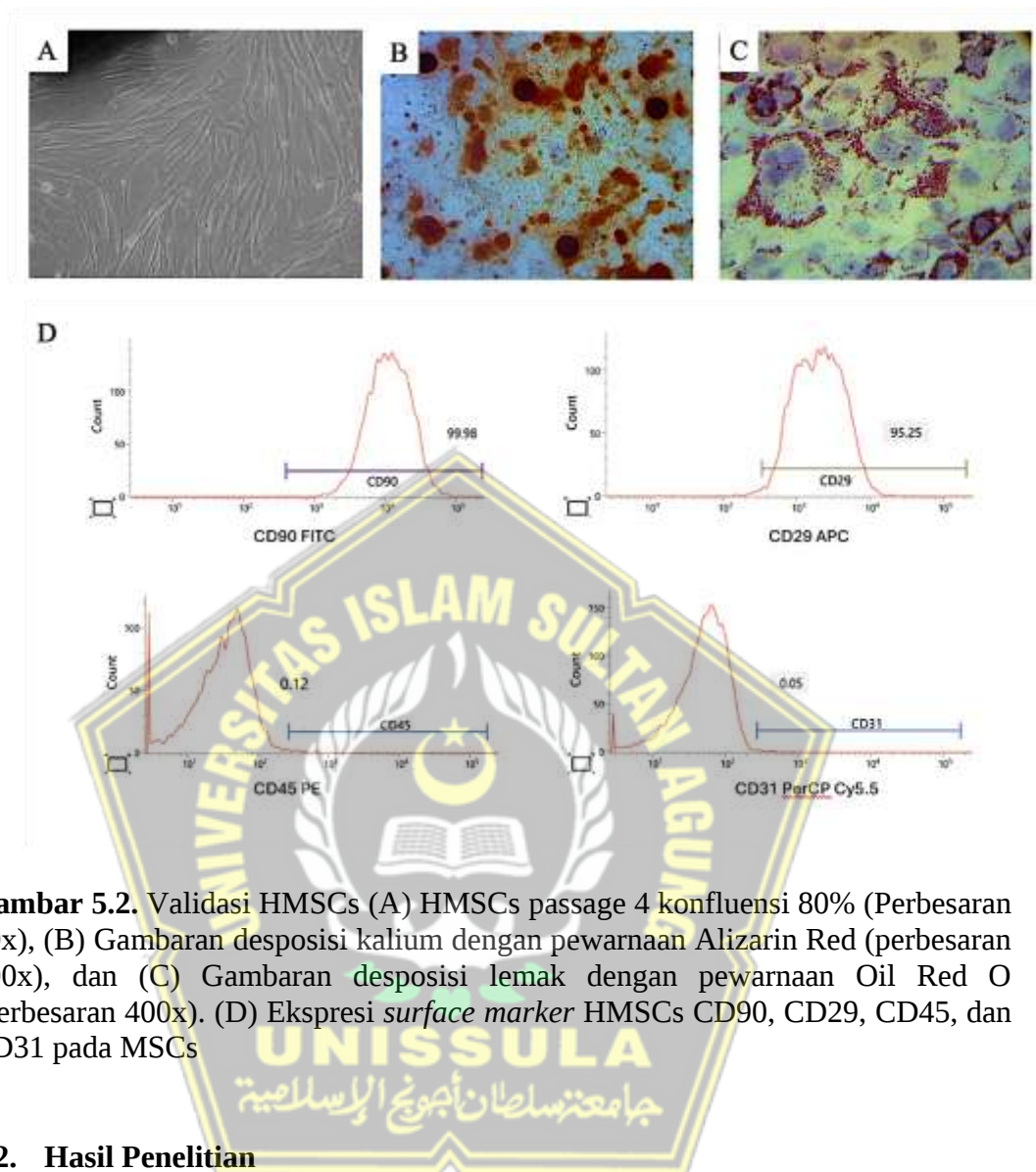
collagen loss pada tikus yang terpapar UVB dibandingkan dengan yang tidak terpapar (Gambar 5.1 C-D).



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

5.1. Hasil Validasi *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*

Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Indonesia (SCCR), Semarang, menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 19 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask kultur dengan medium khusus. Hasil kultur MSCs setelah pasase ke-4 dan dilakukan hipoksia selama 24 jam didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle shape* (Gambar 5.2 A). Sel *hypoxia mesenchymal stem cells* (HMSCs) dikultur dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik selama 14 hari untuk mengetahui kemampuan diferensiasi menjadi sel osteosit dan adiposit sebagai salah satu metode validasi MSCs. Gambaran diferensiasi osteogenik MSCs ditunjukkan oleh sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarin Red* Gambar 5.2 B. Diferensiasi adipogenik MSCs ditunjukkan oleh sel yang berisi akumulasi droplet lipid dengan pewarnaan *Oil Red O* (Gambar 5.2 C). Deposisi kalsium dan lemak hasil diferensiasi HMSCs menjadi osteosit dan adiposit ditunjukkan dengan warna merah pada masing-masing kultur. Hasil isolasi HMSCs divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan HMSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Hasil secara kuantitatif berupa persentase ekspresi positif CD 90 (99,98%), CD 29 (95,25%), dan ekspresi negatif dari CD 45 (0,12%), dan CD 31 (0,05%) (Gambar 5.2 D).



Gambar 5.2. Validasi HMSCs (A) HMSCs passage 4 konfluensi 80% (Perbesaran 40x), (B) Gambaran desposisi kalium dengan pewarnaan Alizarin Red (perbesaran 400x), dan (C) Gambaran desposisi lemak dengan pewarnaan Oil Red O (perbesaran 400x). (D) Ekspresi *surface marker* HMSCs CD90, CD29, CD45, dan CD31 pada MSCs

5.2. Hasil Penelitian

5.2.1. Efek Pemberian HMSCs terhadap Kadar Interleukin-6

Penelitian *Hypoxia Mesencymal Stem Cell* (HMSCs) terhadap kadar IL-6 dan MMP-1 pada tikus galur wistar yang di induksi paparan sinar UVB dianalisis pada hari ke-22. Hasil penelitian tersebut tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda pada Kadar IL-6 dan MMP-3

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Kadar IL-6						
Mean	37,13	272,02	220,94	66,23	42,19	
Std.deviasi	9,40	12,74	17,31	17,48	5,30	
Shapiro Wilk	0,784*	0,210*	0,225*	0,180*	0,879*	
Levene test						0,376**
One Way ANOVA						<0,000***
Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$						

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi IL-6 terendah yaitu pada kelompok tikus sehat sebesar $37,13 \pm 9,40$ pg/mL, kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan K5 yaitu kelompok tikus yang disinari UVB dan diberi perlakuan HMSCs 5×10^5 sel secara subkutan sebesar $42,19 \pm 5,30$, dan selanjutnya kadar IL-6 pada kelompok K4, kelompok tikus yang disinari UVB dan diberi perlakuan HMSCs $2,5 \times 10^5$ sel secara subkutan sebesar $66,23 \pm 17,48$. Rerata kadar IL-6 tertinggi $272,02 \pm 12,74$ adalah kelompok kontrol negatif yang disinari UVB dan hanya diberikan *vehicle* berupa NaCl 0,9% 200uL. Kelompok kontrol positif mengalami penurunan kadar IL-6 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Seluruh kelompok kadar IL-6 berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai *p-value* $> 0,05$ dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data yang homogen dengan nilai *p-value* ($p > 0,05$). Sebaran data normal dan homogen maka analisis data menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian dengan nilai *p-value* 0,000 ($p < 0,05$).

Hasil signifikan pada uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

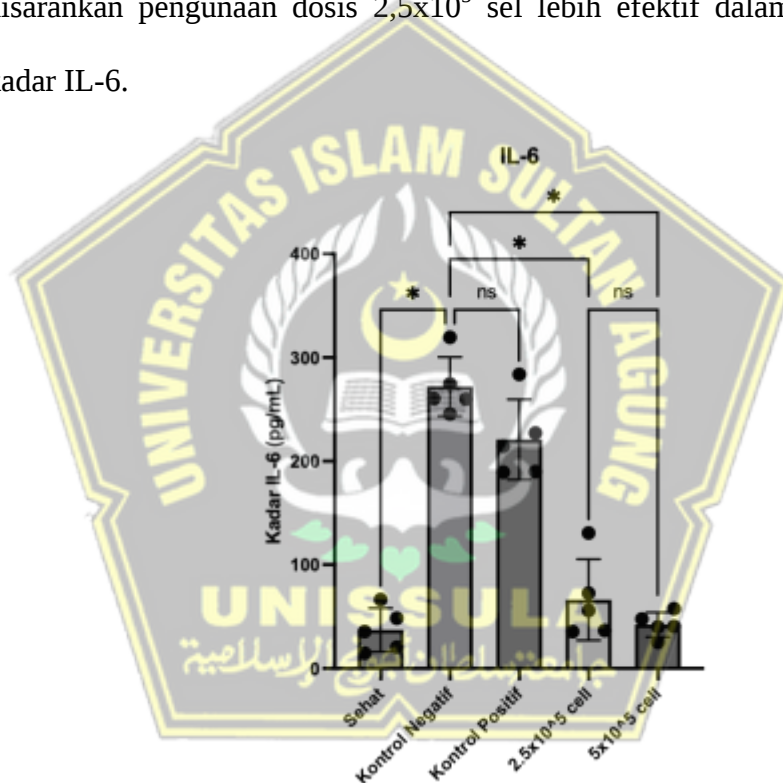
Tabel 5.2. Perbedaan Kadar IL-6 antara Kelompok Penelitian

	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0,001*	0,001*	0,138	0,791
K2	0,001*		0,013*	0,001*	0,001*
K3	0,001*	0,013*		0,001*	0,001*
K4	0,138	0,001*	0,001*		0,216
K5	0,791	0,001*	0,001*	0,216	

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

Hasil uji *post hoc LSD* kadar IL-6 pada tabel 5.2 menunjukkan kadar IL-6 pada kelompok tikus sehat terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok kontrol negatif tikus yang disinari UVB dan diberi perlakuan NaCl 0,9% sebanyak 200 μ L (K2), juga berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif (K3) dengan nilai $p < 0,05$. Kelompok tikus sehat tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan HMSCs K4 dan K5. Kelompok kontrol negatif berbeda signifikan dengan semua kelompok kecuali kelompok kontrol positif K3 menyimpulkan bahwa kelompok kontrol positif tidak efektif dalam menurunkan kadar IL-6. Kelompok perlakuan HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan dosis 5×10^5 sel tidak berbeda signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan dosis 5×10^5 sel berpengaruh secara signifikan terhadap kadar IL-6 pada tikus

jantan galur wistar yang disinari UVB dibandingkan kelompok kontrol negatif, namun pemberian dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan dosis 5×10^5 sel tidak berbeda secara signifikan sehingga kedua dosis tersebut memiliki efektifitas yang sama. Efektifitas yang sama dari kedua dosis yang diujikan terhadap kadar sitokin pro-inflamasi IL-6 menunjukkan bahwa penggunaan dosis rendah memiliki nilai efektifitas sama dengan dosis tinggi, sehingga disarankan penggunaan dosis $2,5 \times 10^5$ sel lebih efektif dalam menurunkan kadar IL-6.



Gambar 5.3. Kadar IL-6 pada tikus model *collagen loss*. Data ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model $\pm$ SD. * $p < 0,05$ berbeda secara signifikan dan ns $p > 0,05$ tidak berbeda secara signifikan.

5.2.2. Efek Pemberian HMSCs terhadap Kadar *Matrix Metaloproteinase-3*

Tabel 5.3. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda pada Kadar IL-6 dan MMP-3

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Kadar MMP-3						
Mean	806,84	8065,20	5492,60	4099,80	3329,00	
Std.deviasi	98,82	384,89	271,98	269,08	192,83	
<i>Shapiro Wilk</i>	0,128*	0,637*	0,356*	0,145*	0,916*	
<i>Levene test</i>						0,021
<i>One Way ANOVA</i>						<0,000***
Keterangan:	*Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$					

Rerata ekspresi MMP-3 terendah yaitu pada kelompok tikus sehat sebesar $806,84 \pm 98,82$ pg/mL, kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan K5 yaitu kelompok tikus yang disinari UVB dan diberi perlakuan HMSCs 5×10^5 sel secara subkutan sebesar $3329,00 \pm 192,83$ pg/mL, dan selanjutnya kadar MMP-3 pada kelompok K4, kelompok tikus yang disinari UVB dan diberi perlakuan HMSCs $2,5 \times 10^5$ sel secara subkutan sebesar $4099,80 \pm 269,08$ pg/mL. Rerata kadar MMP-3 tertinggi $8065,20 \pm 384,89$ pg/mL adalah kelompok kontrol negatif yang disinari UVB dan hanya diberikan *vehicle* berupa NaCl 0,9% 200uL. Kelompok kontrol positif ($5492,60 \pm 271,98$ pg/mL) mengalami penurunan kadar MMP-3 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Seluruh kelompok kadar MMP-3 berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai *p*-

value >0,05 dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data tidak homogen dengan nilai *p-value* 0,021 ($p < 0,05$). Sebaran data normal dan tidak homogen maka analisis data menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian dengan nilai *p-value* 0,000 ($p < 0,05$). Hasil signifikan pada uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

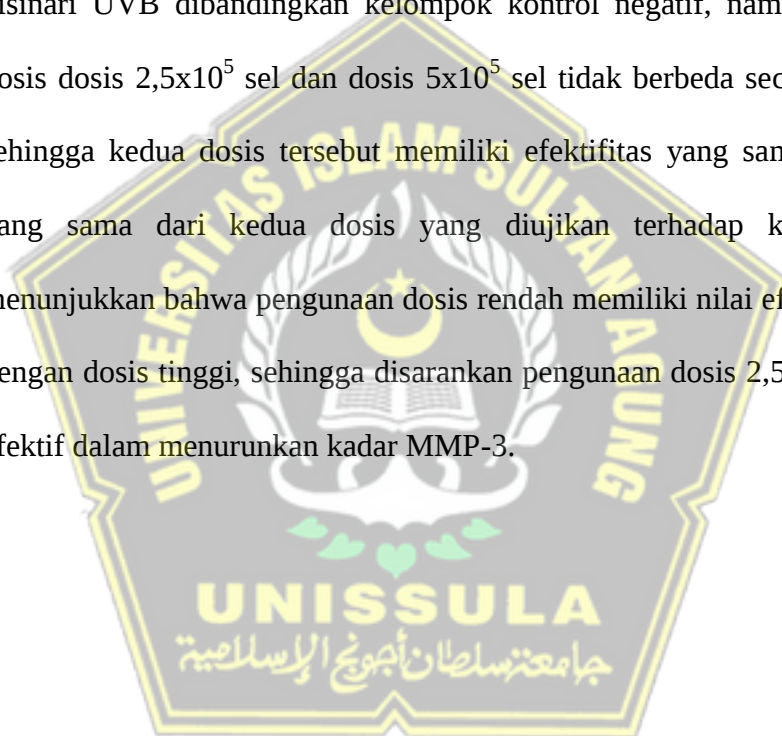
Tabel 5.4. Perbedaan Kadar MMP-3 antara Kelompok Penelitian

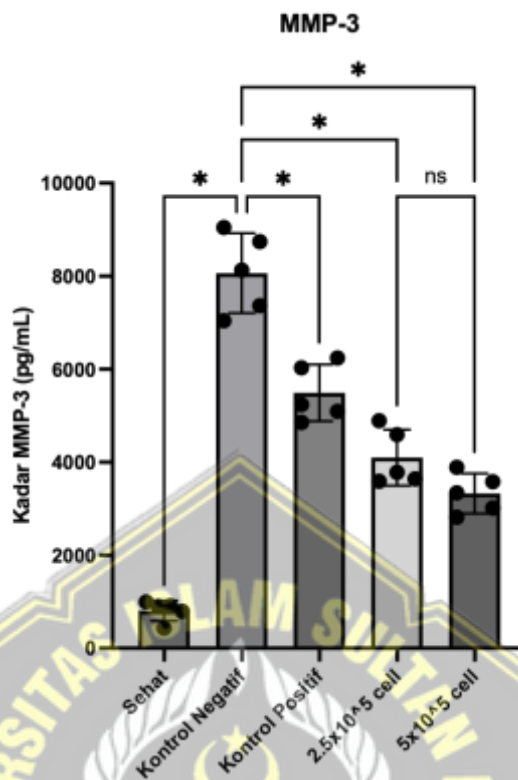
	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
K2	0,001*		0,009*	0,001*	0,001*
K3	0,001*	0,009*		0,064	0,003*
K4	0,001*	0,001*	0,064		0,411
K5	0,001*	0,001*	0,003*	0,411	

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

Hasil uji *post hoc Tamhane* pada tabel 5.3 menunjukkan kadar MMP-3 pada kelompok tikus sehat (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap semua kelompok penelitian baik kelompok tikus kontrol negatif (K2), kelompok kontrol positif (K3), kelompok perlakuan HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel (K4) dan kelompok perlakuan HMSCs dosis 5×10^5 sel dengan nilai $p < 0,001$ ($p < 0,05$). Kelompok kontrol negatif (K2) juga berbeda secara signifikan dengan nilai $p < 0,05$ terhadap semua kelompok penelitian. Kelompok kontrol positif (K3) tidak berbeda signifikan dengan kelompok

perlakuan HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel (K4) dengan nilai $p > 0,05$ (0,064). Pada kelompok perlakuan HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel (K4) juga tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan HMSCs dosis 5×10^5 sel (K5) dengan nilai $p > 0,05$ (0,411). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel berpengaruh secara signifikan terhadap kadar MMP-3 pada tikus jantan galur wistar yang disinari UVB dibandingkan kelompok kontrol negatif, namun pemberian dosis dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan dosis 5×10^5 sel tidak berbeda secara signifikan sehingga kedua dosis tersebut memiliki efektifitas yang sama. Efektifitas yang sama dari kedua dosis yang diujikan terhadap kadar MMP-3 menunjukkan bahwa penggunaan dosis rendah memiliki nilai efektifitas sama dengan dosis tinggi, sehingga disarankan penggunaan dosis $2,5 \times 10^5$ sel lebih efektif dalam menurunkan kadar MMP-3.





Gambar 5.4. Kadar MMP-3 pada tikus model *collagen loss*. Data ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model $\pm$ SD. * $p < 0,05$ berbeda secara signifikan dan ns $p > 0,05$ tidak berbeda secara signifikan.

5.3. Pembahasan

Radiasi sinar UVB merupakan penyebab utama berkurangnya kolagen kulit yang ditandai dengan kondisi stress oksidatif yang berlebihan¹⁰⁵. Respon stress oksidatif yang diinduksi UVB mengaktifasi jalur pensinyalan NF-kB di epidermis yang berdampak pada penekanan sitokin anti inflammasi seperti IL-10 dan peningkatan sitokin pro inflammasi seperti IL-6 sehingga menginduksi berbagai jalur, salah satunya produksi enzim MMP-3^{106,107}. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa peningkatan ROS akan menginduksi inflamasi melalui aktivasi faktor transkripsi NF-kB. NF-kB yang teraktivasi akan bertranslokasi ke nukleus untuk menginduksi

transkripsi sitokin proinflamasi IL-6¹⁰⁸. Peningkatan kadar IL-6 ini akan menekan ekspresi faktor pertumbuhan TGF- β dan menginduksi ekspresi enzim MMP-3 yang menyebabkan sel fibroblast gagal melakukan sintesis kolagen^{108,109}. Hal ini menunjukkan bahwa penurunan kadar IL-6 dan MMP-3 diharapkan dapat menghambat proses pengurangan kolagen yang disebabkan oleh paparan sinar UVB.

Penelitian ini menganalisis kadar IL-6 merupakan sitokin proinflamasi yang berperan dalam induksi inflamasi salah satunya diakibatkan paparan sinar UVB. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat penurunan kadar IL-6 secara signifikan pada kelompok perlakuan HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan dosis 5×10^5 sel dibanding kontrol negatif, dimana penurunan kadar IL-6 yang terendah pada kelompok HMSCs dosis 5×10^5 sel. Hal disebabkan karena semakin besar dosis HMSCs, semakin banyak sel yang dapat menginduksi ekspresi sitokin antiinflamasi IL-10 sehingga dapat menurunkan kadar IL-6¹¹⁰. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa IL-10 mampu berperan dalam penekanan inflamasi melalui aktivasi beberapa protein intraseluler, salah satunya adalah penekan sinyal sitokin 3 (SOSC3)^{111–113}. IL-10 akan berikatan pada receptor dan mengaktifasi jalur pensinyalan *signal transducer and activator of transcription* 3 (STAT-3)^{114,115}. Protein STAT3 akan masuk ke nukleus dan mengaktifasi sekuens mRNA SOSC3¹¹⁶. Protein SOSC3 kemudian diekspresikan secara intraseluler dan menekan berbagai jalur pensinyalan proinflamasi, salah satunya adalah NF-kB¹¹⁷. Penekanan jalur

NF- κ B akan berujung pada penurunan sekresi berbagai sitokin proinflamasi, seperti IL-6¹¹⁸. Pada kelompok 3 pemberian HA hanya sedikit menurunkan kadar IL-6, hal ini dimungkinkan karena dosis HA yang digunakan tidak memiliki aktivitas antiinflamasi yang kuat. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa HA dosis 1mg/mL dapat menekan inflamasi melalui interaksi dengan reseptor membran TLR4. Interaksi ini akan memicu aktivasi glikoprotein CD44 untuk menginduksi diferensiasi keratinosit. Disisi lain, interaksi TLR4 akan mengaktifkan translokasi NF- κ B untuk menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi IL-6¹¹⁹.

Pada penelitian ini kadar MMP-3 mengalami penurunan pada kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan UVB menginduksi peningkatan kadar ROS dan kerusakan DNA pada sel-sel kulit, seperti keratinosit dan fibroblast^{120,121}. Kerusakan DNA mengaktifkan jalur respons stres seluler, termasuk *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang menyebabkan fosforilasi dan aktivasi faktor transkripsi seperti AP-1 dan NF- κ B^{122,123}. Faktor transkripsi yang diaktifkan mengikat elemen respons spesifik dalam promotor gen MMP-3, yang memicu peningkatan transkripsi gen MMP-3¹²⁴. Enzim MMP-3 yang meningkat mampu mendegradasi berbagai komponen matriks ekstraseluler seperti kolagen¹²⁵. Peningkatan kadar MMP-3 selanjutnya dapat mengaktifkan *MMPs family* dan protease lain, yang memperkuat respons degradasi kolagen^{126,127}.

Pemberian HMSCs menunjukkan bahwa HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel mampu secara signifikan menurunkan kadar MMP-3

dibandingkan dengan kontrol negatif. Penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa pemberian MSCs menginduksi *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMPs) sehingga menghambat MMPs termasuk MMP-3 dan MMP-1 serta menginduksi kolagen tipe-1 pada model tikus *wrinkle hairless* SKH-1¹²⁸. Pemberian *conditioned medium* MSCs yang mengandung kadar sitokin pro-inflamasi IL-10 tinggi terbukti menginduksi penurunan ekspresi MMPs pada model tikus hiperpigmentasi⁵. MSCs yang ada di lingkungan mikro kulit dapat merespon kondisi hipoksia dan inflamasi yang disebabkan oleh paparan UVB sehingga MSCs mengaktifkan mekanisme *survival*, termasuk stabilisasi faktor transkripsi *hypoxia-inducible factor-1α* (HIF-1α)^{129,130}. HIF-1α bertranslokasi ke nukleus dan membentuk kompleks dengan kofaktor lain, yang kemudian mengikat *hypoxia response element* (HRE) di daerah promotor gen target. Salah satu gen target yang diturunkan regulasinya oleh kompleks HIF-1α adalah MMP-3^{129,131}. Penekanan ekspresi MMP-3 oleh HMSCs membantu mencegah degradasi kolagen yang berlebihan¹²⁴. HMSCs juga dapat merangsang produksi komponen ECM, termasuk kolagen, melalui aktivasi jalur pensinyalan lain seperti *transforming growth factor-B* (TGF-B)^{132,133}. Semakin besar dosis HMSCs semakin menurunkan kadar MMP-3, namun penurunannya tidak berbeda signifikan dengan dosis rendah $2,5 \times 10^5$ sel. Hal ini dapat dimungkinkan karena waktu dan durasi terapi yang cukup pendek hanya 7 hari pengamatan, sehingga perbedaan efek antar dosis belum terlihat. Interaksi

antara HMSCs dengan kulit yang terpapar UVB juga melibatkan berbagai jalur dan faktor yang kompleks, misalkan penelitian sebelumnya melaporkan bahwa MSCs juga memengaruhi berbagai sitokin inflamasi lainnya seperti IL-6 dan TNF- α serta enzim antioksidan SOD-1. Interaksi kompleks ini dapat menghasilkan efek yang bervariasi pada ekspresi MMPs yang berbeda pada dosis yang berbeda .

HMSCs dapat menginduksi berbagai enzim antioksidan dan molekul anti-inflamasi untuk menghambat ROS dan akhirnya berdampak pada penurunan *stress oksidatif*. Regulasi keseimbangan antara level ROS dan antioksidan sangat penting dalam beberapa jalur transduksi sinyal seluler di antaranya pengaturan sintesis kolagen¹³⁴. Hasil pada penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menjelaskan bahwa HMSCs resisten terhadap rangsangan *oksidatif* dan *nitrosatif in vitro* yang berhubungan dengan enzim antioksidan yang diekspresikan secara konstitutif SOD1, SOD2, katalase (CAT) dan *glutathion peeroksidase* tingkat tinggi sehingga dapat menurunkan kadar *stress oksidatif* dan level inflammasi¹³⁵. *Stres oksidatif* yang netral menyebabkan penurunan MMP-3 sehingga kolagen tidak terdegradasi^{136,137}. Studi menunjukkan bahwa HMSCs dapat meningkatkan produksi kolagen tipe I dan tipe IV melalui domain pengikatan matriks sehingga mencegah kerusakan oksidatif. Tingkat ekspresi MMP-3 yang diinduksi UVB ditemukan berkurang pada tikus transgenik IL-10-overexpressing dibandingkan dengan tikus *wild type*. Dengan demikian, IL-6 dan MMP-3 dapat memainkan peran penting dalam

mengatur kolagen kulit¹³⁸ Temuan ini menunjukkan bahwa menekan MMP-3 dan IL-6 bisa menjadi strategi terapi yang menjanjikan untuk mencegah degradasi kolagen akibat paparan UVB.

Keterbatasan pada penelitian tidak menganalisis jalur transkripsi IL-6 dan MMP-3 melalui NF-KB karena inaktivasi NF-KB dapat menghambat jalur sintesis MMP-3 yang berpotensi mempengaruhi sintesis kolagen. Pada penelitian ini terbukti bahwa kedua dosis HMSCs dapat menurunkan kadar IL-6, namun dosis 5×10^5 sel tidak berbeda signifikan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel. Penurunan yang tidak berbeda secara signifikan ini dimungkinkan karena mekanisme yang terjadi pada jalur NF-kB. NF-kB yang teraktivasi akan bertranslokasi ke nukleus untuk menginduksi transkripsi sitokin proinflamasi IL-6¹⁰⁸. Peningkatan kadar IL-6 ini akan menekan ekspresi faktor pertumbuhan TGF- β dan menginduksi ekspresi enzim MMP-3 yang menyebabkan sel fibroblast gagal melakukan sintesis kolagen^{108,109}. Pada penelitian ini belum dilakukan analisis pada ekspresi NF-kB untuk menjawab kemungkinan hasil kedua dosis tidak berbeda signifikan, sehingga menjadi keterbatasan pada penelitian ini. Pada penelitian ini juga tidak dilakukan pengamatan polarisasi makrofag inflamasi (M1) menjadi makrofag antiinflamasi (M2) yang diinduksi melalui jalur NF-kB dimana telah terbukti bahwa pada penelitian ini IL-6 mengalami penurunan. Keterbatasan pada penelitian ini berpotensi untuk dianalisis lebih mendalam sebagai penelitian lanjutan. Pada penelitian ini hanya dilakukan pada subjek hewan coba dimana telah memperoleh hasil yang menjanjikan bahwa

HMSCs dapat menurunkan kadar IL-6 dan MMP-3 sehingga mencegah collagen loss, penelitian klinis pada sampel manusia perlu dilakukan untuk mengamati efektifitas terapi dan efek samping yang mungkin ditimbulkan setelah penggunaan HMSCs, dosis yang digunakan adalah dosis yang sama dan telah dikonversi menjadi dosis manusia yaitu 56 kali lipat dari dosis pada tikus.



BAB VI

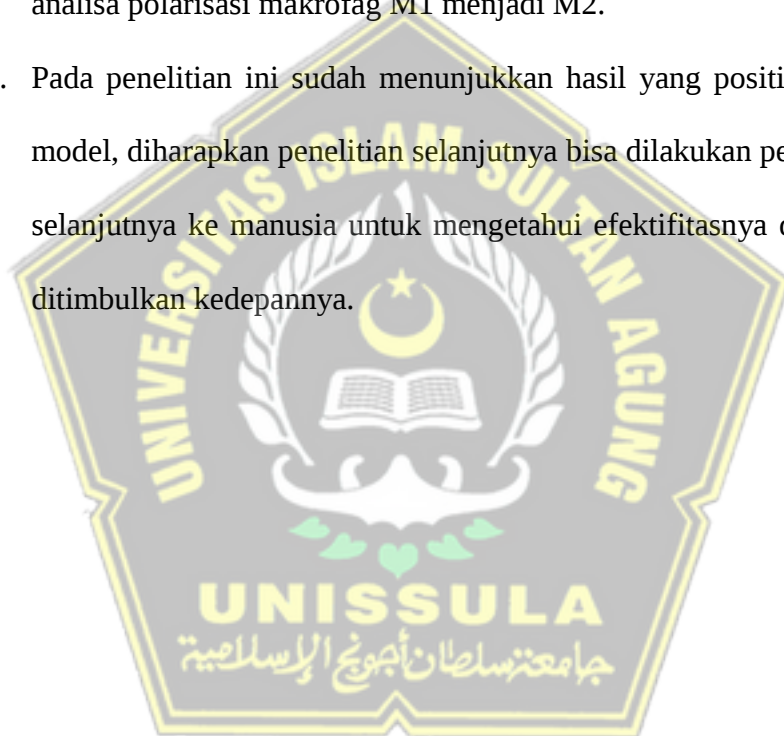
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. HMSCs berpengaruh terhadap penurunan kadar IL-6 secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara injeksi subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel sel dibandingkan kontrol negatif dan kelompok kontrol positif dengan dosis HA 200uL secara *in vivo*.
2. HMSCs berpengaruh terhadap penurunan kadar IL-6 secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara injeksi subkutan dengan dosis 5×10^5 sel dibandingkan kontrol negatif dan kelompok kontrol positif dengan dosis HA 200uL secara *in vivo*.
3. HMSCs berpengaruh terhadap penurunan kadar MMP-3 secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara injeksi subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dibandingkan kontrol negatif dan kelompok kontrol positif dengan dosis HA 200uL secara *in vivo*.
4. HMSCs berpengaruh terhadap penurunan kadar MMP-3 secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi HMSCs secara injeksi subkutan dengan dosis 5×10^5 sel dibandingkan kontrol negatif dan kelompok kontrol positif dengan dosis HA 200uL secara *in vivo*.

6.2. Saran

1. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat menganalisis jalur utama mengenai bagaimana HMSC mampu menurunkan inflamasi melalui *pathway* NF κ B.
2. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat menganalisis jalur utama mengenai bagaimana HMSC mampu menurunkan inflamasi melalui analisa polarisasi makrofag M1 menjadi M2.
3. Pada penelitian ini sudah menunjukkan hasil yang positif pada hewan model, diharapkan penelitian selanjutnya bisa dilakukan penelitian klinis selanjutnya ke manusia untuk mengetahui efektifitasnya dan efek yang ditimbulkan kedepannya.



DAFTAR PUSTAKA

- 1 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.
- 2 Phipps KR, Lee HY, Kim H, Jeon B. Oral administration of a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract (BioCell Collagen®) reduces UVB-induced photoaging in mice. *J Funct Foods* 2020. doi:10.1016/j.jff.2020.103870.
- 3 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.
- 4 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**.
- 5 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.
- 6 Jiang CM, Liu J, Zhao JY, Xiao L, An S, Gou YC *et al.* Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2015; **94**: 69–77.
- 7 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina* 2019; **38**: 164.
- 8 Utami A, Putra A, Wibowo JW, Amalina ND, Satria Irawan RC. Hypoxic secretome mesenchymal stem cells inhibiting interleukin-6 expression prevent oxidative stress in type 1 diabetes mellitus. *Med Glas (Zenica)* 2023; **20**. doi:10.17392/1538-23.
- 9 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.
- 10 Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain (United Kingdom)* 2019; **23**: 874–883.
- 11 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; **70**: 7–30.
- 12 Edwards PC, Fantasia JE. Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. 2007.

- 13 Corrêa MEAB, dos Santos Haupenthal DP, Mendes C, Zaccaron RP, de Roch Casagrande L, Venturini LM *et al.* Effects of Percutaneous Collagen Induction Therapy Associated with Hyaluronic Acid on Inflammatory Response, Oxidative Stress, and Collagen Production. *Inflammation* 2020; **43**: 2232–2244.
- 14 Robati RM, Moeineddin F, Almasi-Nasrabadi M. The Risk of Skin Necrosis Following Hyaluronic Acid Filler Injection in Patients With a History of Cosmetic Rhinoplasty. *Aesthet Surg J* 2018; **38**: 883–888.
- 15 Buhren BA, Schrumpf H, Hoff NP, Bölke E, Hilton S, Gerber PA. Hyaluronidase: From clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *Eur J Med Res* 2016; **21**. doi:10.1186/s40001-016-0201-5.
- 16 Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, D'Alcontres FS. ROS as Regulators of Cellular Processes in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev* 2021; **2021**. doi:10.1155/2021/1208690.
- 17 Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; **129**: 994–1001.
- 18 Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; **174**: 299–306.
- 19 Pittayaprupek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17060868.
- 20 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**: 1196–1202.
- 21 Kim YW, Byzova T V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 2014; **123**: 625–631.
- 22 Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *J Biomed Technol Res* 2014; **1**: 1–21.
- 23 Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji HL *et al.* Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016; **7**. doi:10.1038/cddis.2015.327.
- 24 Kim ES, Jeon HB, Lim H, Shin JH, Park SJ, Jo YK *et al.* Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibits melanogenesis by promoting proteasomal degradation of MITF. *PLoS One* 2015; **10**: 1–11.
- 25 Martinez VG, Ontoria-Oviedo I, Ricardo CP, Harding SE, Sacedon R, Varas A *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α improves immunomodulation by dental mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2017; **8**: 1–12.
- 26 English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013; **91**: 19–26.

- 27 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**: 1–10.
- 28 Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Molecular Therapy* 2018; **26**: 606–617.
- 29 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.
- 30 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.
- 31 Balasubramanian S, Thej C, Walvekar A, Swamynathan P, Gupta PK, Seetharam RN *et al*. Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 2017; **07**: 99–117.
- 32 Van De Walle GR, De Schauwer C, Fortier LA. Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Equine Clinical Immunology* 2016; : 297–310.
- 33 Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2009; **14**: 20–24.
- 34 Sekton B. Matrix metalloproteinases – an overview. *Res Rep Biol* 2010; : 1.
- 35 Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS *et al*. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *J Ethnopharmacol* 2011; **137**: 427–433.
- 36 Pittayapruerk P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17060868.
- 37 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.
- 38 Jung SK, Lee KW, Kim HY, Oh MH, Byun S, Lim SH *et al*. Myricetin suppresses UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by inhibiting Raf. *Biochem Pharmacol* 2010; **79**: 1455–1461.
- 39 Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S *et al*. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med* 2012; **33**: 119–208.

- 40 Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **973**: 31–43.
- 41 Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S *et al.* Sci-Hub | Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Archives of Dermatology*, 138(11) | 10.1001/archderm.138.11.1462. 2002; **138**.
- 42 Wang F, Garza LA, Cho S, Kafi R, Hammerberg C, Quan T *et al.* Effect of increased pigmentation on the antifibrotic response of human skin to UV-A1 phototherapy. *Arch Dermatol* 2008; **144**: 851–858.
- 43 Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A *et al.* *Matrix metalloproteinases: A review*. 1993 doi:10.1177/10454411930040020401.
- 44 Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO Journal* 1990; **9**: 2241–2246.
- 45 Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993; **53**: 288–295.
- 46 Hwang BM, Noh EM, Kim JS, Kim JM, Hwang JK, Kim HK *et al.* Decursin inhibits UVB-induced MMP expression in human dermal fibroblasts via regulation of nuclear factor- κ B. *Int J Mol Med* 2013; **31**: 477–483.
- 47 Wen KC, Fan PC, Tsai SY, Shih IC, Chiang HM. *Ixora parviflora* protects against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs, MAP kinases, and COX-2 and by promoting type I procollagen synthesis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012. doi:10.1155/2012/417346.
- 48 Tewari A, Grys K, Kollet J, Sarkany R, Young AR. Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: Potential implications for photoaging. *Journal of Investigative Dermatology* 2014. doi:10.1038/jid.2014.173.
- 49 Parkinson LG, Toro A, Zhao H, Brown K, Tebbutt SJ, Granville DJ. Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation. *Aging Cell* 2015. doi:10.1111/acer.12298.
- 50 Steinbrenner H, Ramos MC, Stuhlmann D, Sies H, Brenneisen P. UVA-mediated downregulation of MMP-2 and MMP-9 in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **308**: 486–491.
- 51 Chiang HM, Chen HC, Chiu HH, Chen CW, Wang SM, Wen KC. *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after uvb exposure via Ros scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2013; **2013**. doi:10.1155/2013/324864.
- 52 Hwang E, Lee DG, Park SH, Oh MS, Kim SY. Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type I and MMP-1 expression. *J Med Food* 2014; **17**: 985–995.

- 53 Sun ZW, Hwang E, Lee HJ, Lee TY, Song HG, Park SY *et al.* Effects of *Galla chinensis* extracts on UVB-irradiated MMP-1 production in hairless mice. *J Nat Med* 2015; **69**: 22–34.
- 54 Vicentini FTMC, He T, Shao Y, Fonseca MJV, Verri WA, Fisher GJ *et al.* Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *J Dermatol Sci* 2011; **61**: 162–168.
- 55 Park JE, Pyun HB, Woo SW, Jeong JH, Hwang JK. The protective effect of *kaempferia parviflora* extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2014; **30**: 237–245.
- 56 Son WC, Yun JW, Kim BH. Adipose-derived mesenchymal stem cells reduce MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts: Therapeutic potential in skin wrinkling. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015; **79**: 919–925.
- 57 Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, Novotný J, Kolář M, Lacina L *et al.* Interleukin-6: Molecule in the intersection of cancer, ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–25.
- 58 Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ, Chiang HM. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3 β -ol, Isolated from *Antrodia camphorata*, on Hairless mouse skin. *Molecules* 2016; **21**: 1–14.
- 59 Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; **11**. doi:10.3390/nu11061341.
- 60 Cooper S, Bowden G. Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) and Activator Protein-1 (AP-1) in UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; **7**: 325–334.
- 61 Wölfl U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 1081–1093.
- 62 Gupta A, Kaur CD, Jangdey M, Saraf S. Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy. *Ageing Res Rev* 2014; **13**: 65–74.
- 63 Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. doi:10.3390/ijms22083974.
- 64 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.
- 65 Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems* 2018.

- 66 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.
- 67 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. 2019; **38**: 164–171.
- 68 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.
- 69 Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014; : 135–156.
- 70 Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep* 2016; **2**: 168–173.
- 71 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.
- 72 Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
- 73 Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability Ann Rev Biochemistry. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958.
- 74 Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; **2**: 5–10.
- 75 Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol Clin* 2010; **28**: 93–105.
- 76 Edwards QA, Lunat I, Neale LDG, Kulikov SM. Water-Organic Solvent Media. 2015; **13**: 1218–1226.
- 77 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.
- 78 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.
- 79 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.
- 80 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.
- 81 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.
- 82 Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1341–1353.

- 83 Omari S, Makareeva E, Gorrell L, Jarnik M, Lippincott-Schwartz J, Leikin S. Mechanisms of procollagen and HSP47 sorting during ER-to-Golgi trafficking. *Matrix Biol* 2020; : 1–16.
- 84 Xi Q. *Razumikhin-type theorems for impulsive differential equations with piecewise constant argument of generalized type*. 2018 doi:10.1186/s13662-018-1725-5.
- 85 Ishikawa Y, Bächinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2013; **1833**: 2479–2491.
- 86 Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M *et al*. Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; **7**: 305–310.
- 87 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina* 2019; **38**: 164.
- 88 Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, Malik SG. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes* 2013; **6**: 0–7.
- 89 Brand RM, Wipf P, Durham A, Epperly MW, Greenberger JS, Falo LD. Targeting mitochondrial oxidative stress to mitigate UV-induced skin damage. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 1–10.
- 90 Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pereira Lima GP. Antioxidant activity of Y-oryzanol: A complex network of interactions. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17081107.
- 91 Rolfe AJ, Bosco DB, Wang J, Nowakowski RS, Fan J, Ren Y. Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. *Cell Biosci* 2016; **6**. doi:10.1186/s13578-016-0110-x.
- 92 Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ *et al*. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 392–400.
- 93 Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC *et al*. The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; **6**: 1779–1783.
- 94 Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules* 2020; **10**: 1–15.
- 95 Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupár J, Yang X *et al*. TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* 2013; **32**: 1549–1559.

- 96 Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; **174**: 299–306.
- 97 Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal* 2011; **278**: 16–27.
- 98 Yao C, Lee DH, Oh JH, Kim MK, Kim KH, Park CH *et al.* Poly(I : C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2015; **80**: 54–60.
- 99 Nishio T, Usami M, Awaji M, Shinohara S, Sato K. Dual effects of acetylsalicylic acid on ERK signaling and Mitf transcription lead to inhibition of melanogenesis. *Mol Cell Biochem* 2016; **412**: 101–110.
- 100 Razban V, Lotfi AS, Soleimani M, Ahmadi H, Massumi M, Khajeh S *et al.* HIF-1 α overexpression induces angiogenesis in mesenchymal stem cells. *Biores Open Access* 2012; **1**: 174–183.
- 101 Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ *et al.* UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 392–400.
- 102 Fan Y, Jeong JH, You GY, Park JU, Choi TH, Kim S. An Experimental Model Design for Photoaging. *Journal of Craniofacial Surgery* 2015. doi:10.1097/SCS.0000000000001902.
- 103 Darlan DM, Munir D, Putra A, Jusuf NK. MSCs-released TGF β 1 generate CD4+CD25+Foxp3+ in T-reg cells of human SLE PBMC. *Journal of the Formosan Medical Association* 2021; **120**: 602–608.
- 104 Sungkar T, Putra A, Lindarto D, Sembiring RJ. Intravenous Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation Regulates Hyaluronic Acid and Interleukin-10 Secretion Producing Low-grade Liver Fibrosis in Experimental Rat. *Med Arch* 2020; **74**: 177–182.
- 105 Sayama K, Yuki K, Sugata K, Fukagawa S, Yamamoto T, Ikeda S *et al.* Carbon dioxide inhibits UVB-induced inflammatory response by activating the proton-sensing receptor, GPR65, in human keratinocytes. *Sci Rep* 2021; **11**. doi:10.1038/s41598-020-79519-0.
- 106 Subedi L, Lee TH, Wahedi HM, Baek SH, Kim SY. Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**. doi:10.1155/2017/8379539.
- 107 Wölflle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 1081–1093.
- 108 Wu PY, Lyu JL, Liu YJ, Chien TY, Hsu HC, Wen KC *et al.* Fisetin regulates Nrf2 expression and the inflammation-related signaling pathway

- to prevent UVB-induced skin damage in hairless mice. *Int J Mol Sci* 2017; **18**. doi:10.3390/ijms18102118.
- 109 D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*. 2013; **14**: 12222–12248.
 - 110 Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC *et al*. The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; **6**: 1779–1783.
 - 111 Lancellotti P, Oury C. IL-10 targets myofibroblasts and dampens cardiac fibrosis. *J Public Health Emerg* 2017. doi:10.21037/jphe.2017.10.03.
 - 112 Sun Z, Feng Y, Zou M, Zhao B, Liu S, Du Y *et al*. Emerging Role of IL-10 in Hypertrophic Scars. 2020; **7**: 1–8.
 - 113 Muhar AM, Putra A, Warli SM, Munir D. Hypoxia-mesenchymal stem cells inhibit intra-peritoneal adhesions formation by upregulation of the il-10 expression. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; **7**: 3937–3943.
 - 114 Huang YH, Chen MH, Guo QL, Chen ZX, Chen QD, Wang XZ. Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis. *Cell Signal* 2020; **66**: 109445.
 - 115 Wang Y, Van Boxel-Dezaire AHH, Cheon H, Yang J, Stark GR. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 16975–16980.
 - 116 Xu Y, Tong Y, Ying J, Lei Z, Wan L, Zhu X *et al*. Chrysin induces cell growth arrest, apoptosis, and ER stress and inhibits the activation of STAT3 through the generation of ROS in bladder cancer cells. *Oncol Lett* 2018; **15**: 9117–9125.
 - 117 Lee MJ, Agrahari G, Kim HY, An EJ, Chun KH, Kang H *et al*. Extracellular Superoxide Dismutase Prevents Skin Aging by Promoting Collagen Production through the Activation of AMPK and Nrf2/HO-1 Cascades. *Journal of Investigative Dermatology* 2021; **141**: 2344-2353.e7.
 - 118 Schneider LA, Raizner K, Wlaschek M, Brenneisen P, Gethöffer K, Scharffetter-Kochanek K. UVA-1 exposure in vivo leads to an IL-6 surge within the skin. *Exp Dermatol* 2017; **26**: 830–832.
 - 119 Hu L, Nomura S, Sato Y, Takagi K, Ishii T, Honma Y *et al*. Anti-inflammatory effects of differential molecular weight Hyaluronic acids on UVB-induced calprotectin-mediated keratinocyte inflammation. *J Dermatol Sci* 2022; **107**: 24–31.
 - 120 Pardo A, Selman M. MMP-1: The elder of the family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2005; **37**: 283–288.
 - 121 Lee YR, Noh EM, Han JH, Kim JM, Hwang JK, Hwang BM *et al*. Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 2012; **674**: 80–86.
 - 122 Lee SE, Park SH, Oh SW, Yoo JA, Kwon K, Park SJ *et al*. Beauvericin inhibits melanogenesis by regulating cAMP/PKA/CREB and LXR- α /p38 MAPK-mediated pathways. *Sci Rep* 2018; **8**: 1–12.

- 123 Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; **11**. doi:10.3390/nu11061341.
- 124 Mirastschijski U, Lupše B, Maedler K, Sarma B, Radtke A, Belge G *et al*. Matrix metalloproteinase-3 is key effector of TNF- α -induced collagen degradation in skin. *Int J Mol Sci* 2019; **20**. doi:10.3390/ijms20205234.
- 125 Manka SW, Bihan D, Farndale RW. Structural studies of the MMP-3 interaction with triple-helical collagen introduce new roles for the enzyme in tissue remodelling. *Sci Rep* 2019; **9**. doi:10.1038/s41598-019-55266-9.
- 126 Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2009; **14**: 20–24.
- 127 Mirastschijski U, Lupše B, Maedler K, Sarma B, Radtke A, Belge G *et al*. Matrix metalloproteinase-3 is key effector of TNF- α -induced collagen degradation in skin. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 1–14.
- 128 Kwon TR, Oh CT, Choi EJ, Kim SR, Jang YJ, Ko EJ *et al*. Conditioned medium from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes skin moisturization and effacement of wrinkles in UVB-irradiated SKH-1 hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2016; **32**: 120–128.
- 129 Speth JM, Hoggatt J, Singh P, Pelus LM. Pharmacologic increase in HIF1 α enhances hematopoietic stem and progenitor homing and engraftment. *Blood* 2014. doi:10.1182/blood-2013-07-516336.
- 130 Fredianto M, Herman H, Ismiarto YD, Putra A, Alif I, Amalina ND *et al*. Secretome of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells enhance the expression of HIF-1 α and bFGF in a rotator cuff tear model. *Med Glas* 2023; **20**: 242–248.
- 131 Jabeen H, Saleemi S, Razzaq H, Yaqub A, Shakoore S, Qureshi R. Investigating the scavenging of reactive oxygen species by antioxidants via theoretical and experimental methods. *J Photochem Photobiol B* 2018; **180**: 268–275.
- 132 Park YM, Lee MJ, Jeon SH, Hrušová D. In vitro effects of conditioned medium from bioreactor cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on skin-derived cell lines. *Regen Ther* 2021; **18**: 281–291.
- 133 Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Anna N *et al*. The Role of TNF- α Induced MSCs on Suppressive Inflammation.pdf. 2018; **6**: 1779–1783.
- 134 Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci* 2018; **210**: 201–208.
- 135 Stavely R, Nurgali K. The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Transl Med* 2020; **9**: 985–1006.
- 136 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**: 1–14.
- 137 Tutuianu R, Rosca AM, Iacomini 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.
- 138 Miao ZY, Xia X, Che L, Song YT. Genistein attenuates brain damage induced by transient cerebral ischemia through up-regulation of Nrf2 expression in ovariectomized rats. *Neurol Res* 2018. doi:10.1080/01616412.2018.1462879.

