

**PENGARUH *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS*
TERHADAP EKSPRESI GEN NRF2 DAN KADAR GPX**
(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Galur Wistar Model *Collagen Loss* yang
Dipapar Sinar UVB)

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:
Vira Avianti Gunawan
MBK 2322010421

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

TESIS

**PENGARUH *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS*
TERHADAP EKSPRESI GEN NRF2 DAN KADAR GPX
(STUDI EKSPERIMENTAL *IN VIVO* TIKUS GALUR WISTAR
MODEL *COLLAGEN LOSS* YANG DIPAPAR SINAR UVB)**

Disusun oleh :

Vira Avianti Gunawan

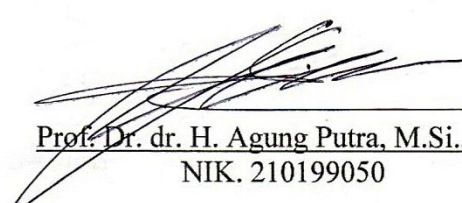
MBK 2322010421

akan dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 3 Januari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,

Pembimbing II,

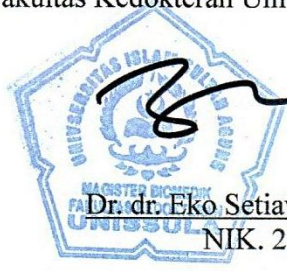


Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si., Med
NIK. 210199050



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

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



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

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan 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



Vira Avianti Gunawan

KATA PENGANTAR

Assalamu alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini dengan judul ***“PENGARUH HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI GEN NRF2 DAN KADAR GPX (Studi Eksperimental In Vivo Tikus Galur Wistar Model Collagen Loss yang Dipapar Sinar UVB)”***.

Penyusunan tesis ini sebagai salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan terselesaikan karena adanya bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih khususnya kepada:

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. Gunarto, S.H., M.Hum
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 Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si Med selaku pembimbing 1 yang telah memberikan masukan dan saran serta meluangkan waktu dalam membimbing penulisan dan penyelesaian tesis.

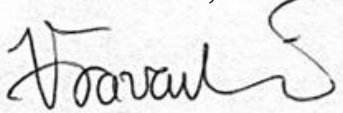
5. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes. selaku pembimbing II yang telah memberikan banyak saran dan motivasi serta meluangkan waktu dalam membimbing penulisan dan penyelesaian tesis.
6. Seluruh Tenaga pendidik Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang memberikan banyak ilmu serta dukungan dalam proses penyusunan tesis.
7. Semua pihak lainnya yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam proses penyusunan tesis.

Dengan menyadari keterbatasan pengalaman, pengetahuan, dan sumber pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki banyak kekurangan dan memerlukan pengembangan lebih lanjut agar benar-benar bermanfaat. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar tesis ini menjadi lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa depan.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua, terutama dalam pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan.

Wassalammua'laikum warohmatullahi wabarakatuh

Semarang, 15 Januari 2025
Penulis,



Vira Avianti Gunawan

ABSTRAK

Latar belakang: Paparan sinar UVB adalah menyebabkan penurunan kolagen akibat peningkatan kadar stress oksidatif sehingga menekan kadar *glutathione peroxidase* (GPx) melalui Nrf2. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh H-MSCs terhadap ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx pada tikus jantan Wistar model *collagen loss* akibat paparan sinar UVB.

Metode: Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan desain post-test only control group dan rancangan acak lengkap. Tikus jantan Wistar 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok 1 tidak diberi perlakuan, Kelompok 2 dipapar UVB dan diberi 200 μ L NaCl, Kelompok 3 dipapar UVB dan diberi 200 μ L HA, Kelompok 4 dan 5 dipapar UVB dan diberi H-MSCs 2,5 $\times 10^5$ sel dan 5 $\times 10^5$ sel dalam 200 μ L NaCl. Kelompok 2 hingga 5 menerima penyinaran UVB dengan dosis 160 mJ/cm², 5 kali seminggu selama 2 minggu pada dorsal tikus. Treatment diberikan pada hari ke-15 dan menganalisis ekspresi gen Nrf2 dengan qRT-PCR sedangkan kadar GPx dengan ELISA pada hari ke-22. Analisis data meliputi uji normalitas, uji homogenitas, dan uji beda menggunakan SPSS.

Hasil: Pemberian H-MSCs dosis 2,5 $\times 10^5$ sel dan 5 $\times 10^5$ sel menginduksi rasio ekspresi gen Nrf2 secara signifikan hingga 1,41 $\pm$ 0,21 dan 1,61 $\pm$ 0,19 dibandingkan ekspresi gen Nrf2 pada kelompok kontrol negatif mengalami penurunan hingga 0,80 $\pm$ 0,21. Peningkatan ekspresi gen Nrf2 sejalan dengan peningkatan kadar GPx, pada kelompok H-MSCs 5 $\times 10^5$ sel memiliki kadar GPx tertinggi yaitu 94,88 $\pm$ 5,34 pg/mL, yang berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif memiliki kadar GPx terendah 36,88 $\pm$ 3,22 pg/mL.

Kesimpulan: Pemberian H-MSCs dapat memperbaiki kondisi *collagen loss* akibat induksi sinar UVB melalui peningkatan ekspresi gen Nrf2 and kadar GPx.

Kata Kunci : *Collagen Loss*, HMSC, Nrf2, GPx

ASBTRACT

Background: UVB radiation causes collagen loss due to increased oxidative stress, suppressing GPx levels through Nrf2. This study aims to analyze the effect of H-MSCs on Nrf2 gene expression and GPx levels in male Wistar rats with UVB-induced collagen loss.

Methods: This experimental study employed a post-test-only control group design with a completely randomized arrangement. Twenty-five male Wistar rats were divided into 5 groups. Group 1 received no treatment, Group 2 was exposed to UVB and given 200 μ L NaCl, Group 3 was exposed to UVB and given 200 μ L HA, while Groups 4 and 5 were exposed to UVB and treated with H-MSCs at doses of 2.5×10^5 and 5×10^5 cells in 200 μ L NaCl, respectively. Groups 2 through 5 received UVB irradiation at a dose of 160 mJ/cm², 5 times a week for 2 weeks on the dorsal skin. Treatments were administered on day 15, and Nrf2 gene expression was analyzed using qRT-PCR, while GPx levels were measured by ELISA on day 22. Data analysis included normality and homogeneity tests, followed by difference tests using SPSS.

Results: Administration of H-MSCs at doses 2.5×10^5 and 5×10^5 cells significantly induced Nrf2 gene expression ratios to 1.41 ± 0.21 and 1.61 ± 0.19 , respectively, compared to the negative control group (0.80 ± 0.21). The Nrf2 gene expression was increased on corresponded with elevated GPx levels, with the 5×10^5 cell H-MSCs group exhibiting the highest GPx level at 94.88 ± 5.34 pg/mL, significantly different from the negative control group, which had the lowest GPx level at 36.88 ± 3.22 pg/mL.

Conclusion: H-MSCs administration can ameliorate UVB-induced collagen loss by increasing Nrf2 gene expression and GPx levels.

Keywords: Collagen Loss, H-MSCs, Nrf2, GPx

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat penelitian	5
1.4.1. Manfaat Teoritis	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. <i>Nuclear factor-erythroid-2 related factor 2</i> (Nrf2).....	9
2.1.1. Definisi <i>Nuclear factor-erythroid-2 related factor 2</i> (Nrf2)	9
2.1.2. Mekanisme Molekuler Nrf2	9
2.1.3. Peran Nrf2 terhadap Stres Oksidatif	10
2.2. Glutathione Peroxidase (GPx)	11
2.2.1. Definisi Glutathione Peroxidase (GPx).....	11

2.2.2.	Mekanisme Molekuler GPx	11
2.2.3.	Peran GPx terhadap stres oksidatif	12
2.2.4.	Faktor-faktor yang mempengaruhi GPx	13
2.3.	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs).....	14
2.3.1.	Definisi <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs)	14
2.3.2.	Karakteristik <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs)	16
2.3.3.	Mobilisasi MSC	17
2.3.4.	Konsep <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSC	18
2.3.5.	Induksi <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSC	19
2.4.	Ultraviolet B (UVB)	21
2.4.1.	Photoaging	22
2.4.2.	Kolagen	23
2.5.	Pengaruh H-MSCs terhadap Ekspresi Nrf2 dan GPx Tikus Model <i>Collagen Loss</i>	26
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS		31
3.1.	Kerangka Teori.....	31
3.2.	Kerangka Konsep.....	34
3.3.	Hipotesis	34
BAB IV METODE PENELITIAN		35
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	35
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	37
4.2.1.	Variabel Penelitian.....	37
4.2.2.	Definisi Operasional.....	37
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	39
4.3.4.	Besar Sampel.....	40
4.4.	Alat dan Bahan.....	40
4.4.1.	Alat.....	40
4.4.2.	Bahan.....	41

4.5. Prosedur Pelaksanaan Penelitian.....	42
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	42
4.5.2. Induksi <i>Collagen Loss</i>	43
4.5.3. Isolasi MSCs dari <i>Umbilical Cord</i> (UC).....	43
4.5.4. Pemanenan dan Penghitungan MSCs	45
4.5.5. Validasi MSCs.....	46
4.5.6. Proses Hipokia	48
4.5.7. Perlakuan pada Hewan Coba	49
4.5.8. Uji Ekspresi Nrf2	49
4.5.9. Uji Kadar GPx.....	52
4.6. Waktu dan tempat Penelitian.....	53
4.7. Analisis Data.....	53
4.8. Alur Penelitian	55
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	56
5.1. Hasil Validasi <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i> (H-MSCs).....	58
5.2. Hasil Penelitian	59
5.2.1. Efek Pemberian H-MSCs terhadap Ekspresi Gen <i>Nrf2</i>	59
5.2.2. Efek Pemberian H-MSCs terhadap Kadar <i>GPx</i>	63
5.3. Pembahasan.....	66
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	71
6.1. Kesimpulan	71
6.2. Saran	72
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN.....	79

DAFTAR SINGKATAN

APE-1	: Aktivator Protein-1
ARE	: <i>Antioxidant Response Element</i>
CAT	: Catalase
CD	: <i>Cluster Of Differentiation</i>
DEJ	: <i>Dermal-Epidermal Junction</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DVL	: <i>disheveled</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	: <i>Erythropoietin</i>
EpRE	: <i>Electrophile Response Elements</i>
FGF	: <i>fibroblast growth factor</i>
GAPDH	: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GCFS	: <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
GM-CFS	: <i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GPx	: <i>Glutation Peroksidase</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
GS-SG	: <i>Glutathione Disulfide</i>
GSK3	: <i>glycogen synthesa kinase 3</i>
HGF	: <i>hepatocyte growth factor</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hydrogen Peroxide</i>
HA	: <i>Hyaluronic Acid</i>
HIF-1 α	: <i>Hypoxia Infucible Factor 1 Alpha</i>
H-MSCs	: <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
HO-1	: <i>Heme Oxygenase-1</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRAK	: <i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
ISCT	: <i>International Society for Cellular Therapy</i>
IKK	: <i>kinase IκB</i>

Keap-1	: <i>Kelch-like ECH Association Protein 1</i>
miRNA	: <i>MicroRNA</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinases</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MyD88	: <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
MEK1	: <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NO	: <i>Nitrit Oxid</i>
Nrf2	: <i>NF-E2-related factor 2</i>
NRX	: <i>nuclear redox protein</i>
PBS	: <i>Phospat Buffer Salin</i>
pg	: <i>picogram</i>
PIGF	: <i>Placental Growth Factor</i>
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
PPARγ	: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
PDGF	: <i>plateletderived growth factors</i>
post hoc LSD	: <i>Least Significant Difference</i>
PI3K	: <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
qRT-PCR	: <i>Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RSeH	: <i>Selenol</i>
RSeOH	: <i>Selenenic Acid</i>
R-SO ₂ H	: <i>Sulfenic Acid</i>
SCF	: <i>Stem Cell Factor</i>
SDF-1	: <i>Stromal-Derived Factor-1</i>
siRNA	: <i>Small Interfering RNA</i>
SIRT	: <i>Sirtuins</i>

SOCS3	: <i>Supressor of Cytokine Signalling-3</i>
SOD	: <i>Superoxide Dysmuthase</i>
SPF	: <i>Sun Protection Factor</i>
STAT3	: <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
<i>Sirt1</i>	: <i>sirtuins 1</i>
TAK1	: <i>TGF-β-activated kinase 1</i>
TLR	: <i>T-cell receptor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
TRADD	: <i>TNFR1- associated death domain</i>
TGF-B	: <i>growth factors transforming growth factor-B</i>
UVB	: <i>Ultra Violet B</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
μ L	: <i>mikroliter</i>



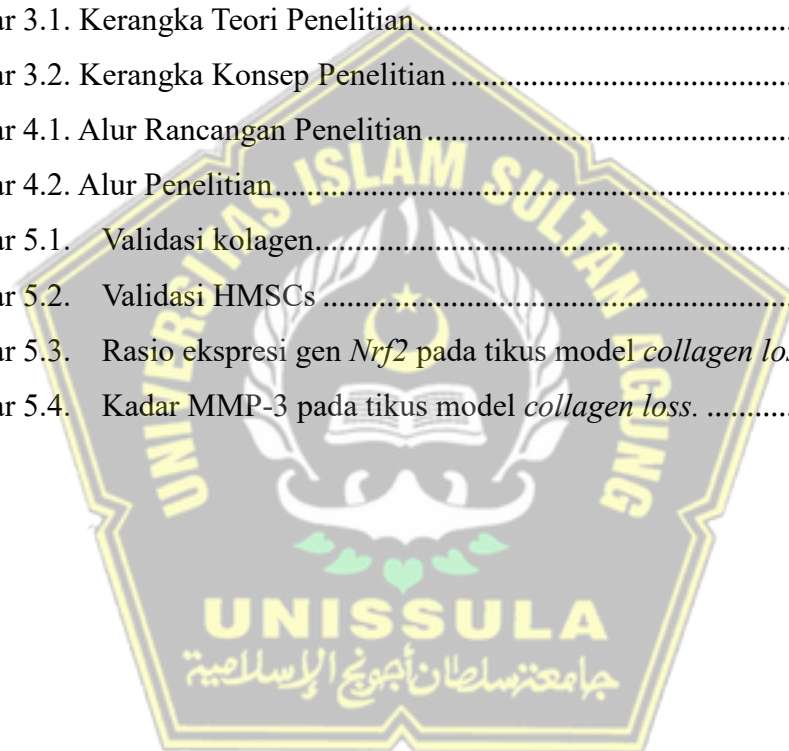
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 2.1.	Perbandingan Perubahan Histologis Dan Klinis Yang Terbukti Pada Penuaan Kronologis Dan Photoaging.....	22
Tabel 3.1.	Reagen yang digunakan dalam analisis <i>flow cytometry</i>	47
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Ekspresi gen <i>Nrf2</i> dan Kadar <i>GPx</i>	60
Tabel 5.2.	Perbedaan Ekspresi gen <i>Nrf2</i> antara kelompok penelitian.....	61
Tabel 5.3.	Perbedaan Kadar <i>GPx</i> antara kelompok penelitian.....	64



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Kemampuan Diferensiasi dari MSC.....	15
Gambar 2.2. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs)	15
Gambar 2.3. Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC	19
Gambar 2.4. Lingkungan Hipoksia Mengaktivasi MSC	20
Gambar 2.5. Penetrasi radiasi ultraviolet (UVR) ke dalam kulit.	21
Gambar 2.6. Jenis Kolagen pada Kulit	24
Gambar 3.1. Kerangka Teori Penelitian	33
Gambar 3.2. Kerangka Konsep Penelitian	34
Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian	36
Gambar 4.2. Alur Penelitian.....	55
Gambar 5.1. Validasi kolagen.....	57
Gambar 5.2. Validasi HMSCs	59
Gambar 5.3. Rasio ekspresi gen <i>Nrf2</i> pada tikus model <i>collagen loss</i>	62
Gambar 5.4. Kadar MMP-3 pada tikus model <i>collagen loss</i>	65



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	79
Lampiran 2. Statistika	80
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian.....	88



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan sinar ultraviolet B (UVB) merupakan faktor utama penyebab berbagai permasalahan pada kulit, terutama *photoaging* dan *wrinkle* ¹. Radiasi UVB menyebabkan peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) dan *nitrit oxide* (NO) yang berujung pada penurunan kadar kolagen pada kulit ². ROS dan NO meningkatkan ekspresi dan aktivitas *Matrix Metalloproteinases* (MMP), enzim yang mendegradasi komponen matrix ekstraseluler seperti kolagen adalah MMP-1 (kolagenase-1) ². Dalam menghadapi stres oksidatif, tubuh memiliki mekanisme pertahanan yang diatur oleh faktor transkripsi *Nuclear Factor-Erythroid-2 Related Factor 2* (Nrf2) ². Nrf2 berperan dalam mengatur ekspresi berbagai enzim antioksidan, termasuk *Glutathione Peroxidase* (GPx), yang bertugas menetralkan ROS dan mencegah kerusakan oksidatif lebih lanjut ². Dalam keadaan normal, *nuclear factor-erythroid-2 related factor 2* (Nrf2) membentuk kompleks dengan *repressor kelch-like ECH association protein 1* (Keap1) di sitoplasma. Paparan radiasi UVB menyebabkan Nrf2 terpisah dari kompleks Nrf2/Keap-1 dan ditranslokasikan ke nucleus ². Akibatnya *heme oxygenase-1* (HO-1) and antioxidant enzymes *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx), and *catalase* (CAT) diregulasi ². GPx adalah salah satu enzim utama yang bertanggung jawab untuk mengubah *hidrogen peroksida* (H₂O₂) yang merupakan ROS menjadi air dan oksigen,

sehingga mengurangi akumulasi radikal bebas di dalam sel ³. Peningkatan ekspresi Nrf2 dan kadar GPx dianggap penting dalam mekanisme perbaikan jaringan yang rusak akibat paparan UVB ². Penurunan kolagen dan induksi *wrinkle* diakibatkan karena ketidakseimbangan produksi ROS dengan ekspresi gen Nrf2 sebagai faktor transkripsi gen antioksidan, salah satunya adalah penurunan kadar enzim antioksidan GPx sehingga mempercepat proses penuaan pada kulit ⁴. *Mesenchymal stem cells* (MSCs) memiliki keunggulan antara lain kemampuan *self-renewal* dan *differensiasi*, memiliki sifat *immunodulator* dan memiliki kemampuan *homing* ⁵. Pemberian *hypoxic mesenchymal stem cells* (H-MSCs) mampu meningkatkan ekspresi gen Nrf2 intraseluler dan memproduksi eksosom yang mengandung berbagai macam antioksidan, salah satunya adalah GPx ^{6,7}. Dalam uji klinis MSCs frekuensi dosis, interval dan dosis sangat bervariasi. Dosis biasanya dijelaskan dalam sel/kg berat badan ($0,5 - 12 \times 10^6$ sel/kg sebagai dosis tunggal) ⁸. Penelitian dengan menyuntikkan MSCs dosis konsentrasi sel $0,5 \times 10^6$ melalui subcutan dapat menghambat proses inflamasi patofisiologis pada fase akut dan meningkatkan regenerasi ⁹. Hal ini menunjukkan bahwa diperlukan studi lebih lanjut mengenai potensi H-MSCs dalam meningkatkan ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx pada tikus *collagen loss* yang diinduksi paparan UVB dengan dosis $2,5 \times 10^5$ dan 5×10^5 sel.

Insiden kelainan kulit yang berhubungan dengan sinar ultraviolet meningkat seiring bertambahnya usia dan berkembang selama beberapa dekade ¹⁰. Penelitian melaporkan bahwa 83% orang mengalami kondisi

penuaan kulit dini dan memburuk setelah usia 30 tahun yang berupa munculnya kerutan dan penurunan elastisitas kulit akibat paparan UVB yang berujung pada penurunan kolagen ¹¹. Studi lainnya menunjukkan bahwa terjadi perubahan lebih dari 50% pada kulit yang terbuka akibat paparan UV berupa wrinkles, penurunan elastisitas kulit dan xerosis ¹². Terapi dengan *hyaluronic acid* (HA) telah terbukti efektif menginduksi sintesis kolagen melalui mekanisme mengikat reseptor seperti CD44, *receptor for HA mediated motility* (RHAMM) dan *vascular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) pada sel fibroblas ^{13,14}. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa penggunaan HA mereduksi ekspresi *matrix metalloproteinase 1* (MMP-1) sehingga degradasi kolagen terhambat ¹³. Penggunaan jangka panjang HA menyebabkan efek merugikan pada kulit seperti reaksi inflamasi berlebihan, alergi, hingga menyebabkan kanker kulit ¹⁵.

MSCs merupakan *stem cell multipotent* dewasa yang dikarakterisasi dengan ekspresi positif penanda protein membran CD73, CD90, CD105, CD29 dan CD44 serta ekspresi negatif CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79a atau CD19, dan HLA-DR berdasarkan *international society for cellular therapy* (ISCT)¹⁶. MSCs mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi osteosit, adiposit, kondrosit dan sel saraf ⁷. Kondisi hipoksia pada MSCs diketahui dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan ekspresi berbagai macam antioksidan, seperti GPx, *superoxide dismutase* (SOD)1, SOD2, *catalase* (CAT) dan sirtuin (SIRT)1 dan 3^{6,17}. Berbagai macam antioksidan yang diekspresikan secara

langsung oleh MSCs melalui eksosom, seperti GPx mampu mengaktivasi faktor transkripsi Nrf2 yang berujung pada peningkatan ekspresi antioksidan¹⁸. Hal tersebut menunjukkan bahwa H-MSCs mampu berperan dalam menurunkan stres oksidatif akibat paparan UVB, namun potensi H-MSCs dalam memperbaiki *collagen loss* akibat paparan UVB melalui ekspresi Nrf2 dan GPx belum pernah dilakukan.

Berdasarkan studi tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh H-MSCs terhadap ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx pada kulit tikus model *collagen loss* yang diinduksi paparan UVB dengan dosis 2.5×10^5 dan 5×10^5 sel.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah apakah terdapat pengaruh pemberian H-MSCs terhadap ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx pada tikus model *collagen loss*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian H-MSCs terhadap ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx pada tikus model *collagen loss*?

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan peningkatan ekspresi gen Nrf2 pada tikus model *collagen loss* setelah pemberian H-MSCs pada dosis 2.5×10^5 dan 5×10^5 dibandingkan kontrol.
2. Membuktikan peningkatan kadar GPx pada tikus model *collagen loss* setelah pemberian H-MSCs pada dosis 2.5×10^5 dan 5×10^5 dibandingkan kontrol.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teoritis adalah memberikan ilmu pengetahuan bahwa pemberian H-MSCs dapat meningkatkan ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx pada tikus model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B.

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat penelitian ini secara praktis adalah menjadi data dasar bagi penelitian terapan yang bermuara pada produksi produk H-MSCs untuk terapi *collagen loss*.

1.5. Originalitas Penelitian

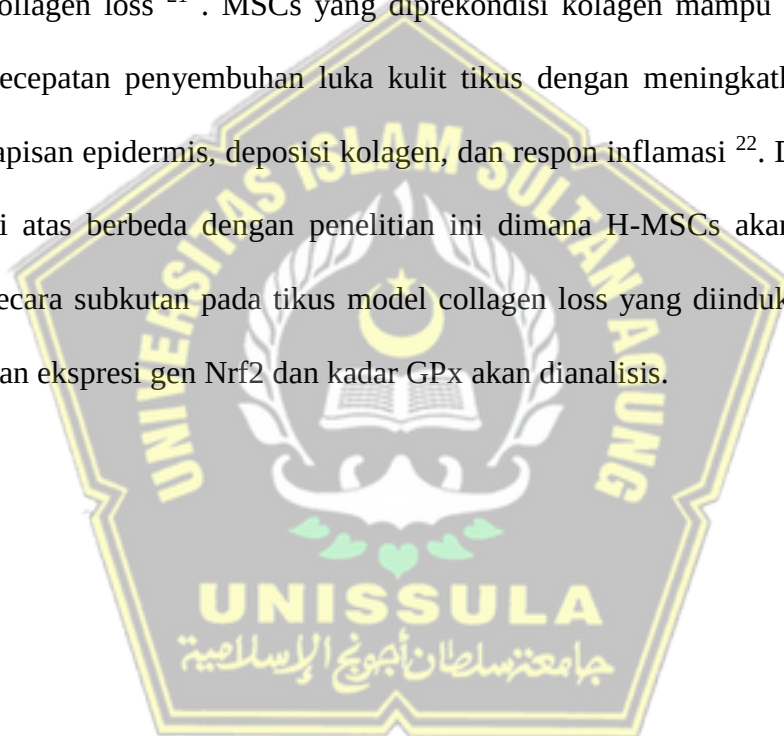
Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Silina,E.;Stupin,V.; Koreyba, K.; Bolevich, S.; Suzdaltseva, Y.; Manturova, N, 2021 ⁹	Local and Remote Effects of Mesenchymal Stem Cell Administration on Skin Wound Regeneration	<i>In vitro</i> eksperimental	MSCs efektif untuk penyembuhan terhadap luka akibat proses inflamasi dan meningkatkan proses regenerasi.
2	Araceli Valle-Prieto dan Paulette A. Conget, 2010 ¹⁹	Human Mesenchymal Stem Cells Efficiently Manage Oxidative Stress	<i>In vitro</i> eksperimental	MSCs resisten terhadap stimuli oksidatif dan nitrosatif <i>in vitro</i> dengan memproduksi enzim antioksidan seperti SOD1, SOD2, CAT, GPx, SIRT1, SIRT3 and <i>antioxidant glutathione</i> (GSH).
3	Ying-Wei Lan, Kong-Bung Choo, Chuan-Mu Chen, Tsai-Hsien Hung, Young-Bin Chen, Chung-Hsing Hsieh, Han-Pin Kuo, and Kowit-Yu Chong, 2015 ¹⁷	Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis	<i>In vivo</i> eksperimental	H-MSCs meningkatkan kemampuan anti-inflamasi dan antioksidatif-nya dengan mengekspresikan <i>hypoxia infucible factor 1 alpha</i> (HIF-1 α), IL-10, CAT, dan GPx yang berasosiasi dengan peningkatan aktivitas translokasi Nrf2 dari sitoplasma menuju nukleus.
4	Haojie Fu, Lin Sen, Fangqi Zhang, Sirui Liu, Meiyue Wang,	Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles	<i>In vitro</i> , eksperimental	MSCs mampu mengekspresikan vesikel ekstraseluler yang mampu menetralkan stres

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
	Hongyan Mi, Mengzhe Liu, Bingyan Li, Shumin Peng, Zelong Hu, Jingjing Sun, and Rui Li, 2023 ²⁰	protect against oxidative stress-induced xenogeneic biological root injury via adaptive regulation of the PI3K/Akt/Nrf2 pathway		oksidatif melalui regulasi jalur PI3K/Akt/Nrf2
5	Erlina Pricilla, Indah Julianto, Harijono Kariosentono, 2017 ²¹	The effect of injection of ADSC compared to APPE on collagen density in aging skin	<i>In vivo</i> , eksprimental	MSCs meningkatkan densitas kolagen pada sel fibroblast kulit tikus model <i>collagen loss</i> .
6	Zheng Kou, Balun Li, Aili Aierken, Ning Tan, Chenchen Li, Miao Han, Yuanxiang Jing, Na Li, Shiqiang Zhang, Sha Peng, Xianjun Zhao, and Jinlian Hua, 2023 ²²	Mesenchymal Stem Cells Pretreated with Collagen Promote Skin Wound-Healing	<i>In vivo</i> , eksprimental	MSCs yang diprekondisi kolagen mampu meningkatkan kecepatan penyembuhan luka kulit tikus dengan meningkatkan perbaikan lapisan epidermis, deposisi kolagen, dan respon inflamasi.

Pada penelitian membuktikan bahwa MSCs efektif untuk penyembuhan terhadap luka akibat proses inflamasi dan meningkatkan proses regenerasi dosis konsentrasi sel $0,5 \times 10^6$ ⁹. MSCs resisten terhadap stimuli oksidatif dan nitrosatif *in vitro* dengan memproduksi enzim antioksidan seperti SOD1, SOD2, CAT, GPx, SIRT1, SIRT3 and antioxidant glutathione (GSH) ¹⁹. H-MSCs meningkatkan kemampuan anti-

inflamasi dan antioksidatif-nya dengan mengekspresikan hypoxia infucible factor 1 alpha (HIF-1 α), IL-10, CAT, dan GPx yang berasosiasi dengan peningkatan aktivitas translokasi Nrf2 dari sitoplasma menuju nukleus ¹⁷ . MSCs mampu mengekspresikan vesikel ekstraseluler yang mampu menetralkan stres oksidatif melalui regulasi jalur PI3K/Akt/Nrf2 ²⁰ . MSCs meningkatkan densitas kolagen pada sel fibroblast kulit tikus model collagen loss ²¹ . MSCs yang diprekondisi kolagen mampu meningkatkan kecepatan penyembuhan luka kulit tikus dengan meningkatkan perbaikan lapisan epidermis, deposisi kolagen, dan respon inflamasi ²² . Dari penelitian di atas berbeda dengan penelitian ini dimana H-MSCs akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model collagen loss yang diinduksi sinar UVB dan ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx akan dianalisis.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Nuclear factor-erythroid-2 related factor 2 (Nrf2)*

2.1.1. Definisi *Nuclear factor-erythroid-2 related factor 2 (Nrf2)*

Nuclear factor-erythroid-2 related factor 2 (Nrf2) merupakan sebuah faktor transkripsi yang memiliki peran penting dalam mengatur produksi enzim antioksidan yang terlibat dalam pengendalian stres oksidatif ²³. Nrf2 sebelumnya dianggap sebagai penghambat tumor yang memberikan proteksi terhadap ROS dan penyebaran penyakit kanker ²³. Namun, Nrf2 juga merupakan aktivator antioksidan yang berperan penting dalam pengendalian kondisi penuaan atau *aging*, terutama akibat paparan UVB ²³. Nrf2 dapat diaktifkan oleh adanya oksidan, elektrofil, ataupun stres retikulum endoplasma ²⁴.

2.1.2. Mekanisme Molekuler Nrf2

Dalam kondisi normal, Nrf2 tidak aktif dan berada di sitoplasma, terikat dengan 12 molekul repressor *kelch-like ECH association protein 1 (Keap1)*, membentuk kompleks Nrf2-Keap1 ²⁵. Keap1 memiliki beberapa residu sistein yang berfungsi sebagai sensor untuk status redoks intraseluler ²³. Sinyal dari ROS dan elektrofil akan mengakibatkan disosiasi Nrf2 dari keap1, sehingga Nrf2 akan bertranslokasi menuju nukleus ²⁵. Nrf2 di dalam nukleus

kemudian terikat pada sekuens regulator yang disebut *antioxidant response element* atau *electrophile response elements* (ARE/EpRE)²⁶. Nrf2 juga memodulasi ekspresi HIF2 (*Hypoxia-Inducible Factor* 2), yang penting untuk respon terhadap kondisi hypoxia²⁷. Lokasi tersebut terletak di region promotor dari gen pengkode antioksidan dan enzim detoksifikasi²⁸. Proses ini juga didukung oleh heterodimerisasi dari Nrf2 dengan faktor transkripsi lainnya, seperti s-Maf, yang berada dalam nukleus^{23,26}. Mekanisme tersebut berujung pada peningkatan transkripsi berbagai antioksidan seperti GPx, CAT, SOD dan *heme oksigenase-1* (HO-1)².

2.1.3. Peran Nrf2 terhadap Stres Oksidatif

Nrf2 berperan dalam aktivasi berbagai gen yang mengkode antioksidan untuk melindungi kerusakan jaringan yang diakibatkan oleh ROS²³. Nrf2 dapat secara langsung menurunkan transkripsi mRNA, siRNA, miRNA yang bertanggung jawab terhadap stres oksidatif²⁹. Nrf2 juga meningkatkan transkripsi berbagai antioksidan seperti GPx, CAT, SOD dan HO1². Enzim protektif tersebut dengan cepat akan menetralkan akumulasi stres oksidatif yang diakibatkan oleh UVB². Nrf2 juga berperan dalam menghambat faktor transkripsi NF-κB sehingga terjadi penurunan proses inflamasi dan stres oksidatif³⁰. Disfungsi Nrf2 menyebabkan penurunan penghambatan terhadap faktor transkripsi NF-κB, yang

mengakibatkan peningkatan ekspresi gen-gen yang mengkode mediator inflamasi serta akumulasi ROS.³⁰.

2.2. Glutathione Peroxidase (GPx)

2.2.1. Definisi Glutathione Peroxidase (GPx)

Glutathione peroxidase (GPx) adalah enzim yang memiliki aktivitas peroksidase yang mengubah H_2O_2 menjadi H_2O atau *lipid hydroperoxides* menjadi alkohol³¹. Glutathione peroxidase memiliki beberapa isozim, yang berbeda dalam lokasi selular dan spesifiktas substrat³. Hingga saat ini, telah dikenal 8 jenis isozim GPx yang berbeda³². Isozim GPx1 adalah GPx yang paling banyak ditemukan di sitoplasma sel yang dapat menangani stres oksidatif, termasuk hidrogen peroksida sebagai substrat³. GPx4 memiliki kemampuan pengikatan yang tinggi terhadap lipid hydroperoksida dan ditemukan di sel mamalia, tetapi pada kadar yang lebih rendah³. GPx2 adalah isozim intestinal dan ekstraseluler, sementara GPx3 adalah isozim ekstraseluler yang banyak terkandung di dalam plasma darah³.

2.2.2. Mekanisme Molekuler GPx

Mechanisme molekuler GPx berkaitan dengan ROS dan stres oksidatif³². Oksidasi sistein dimulai dengan oksidasi residu cystein di GPx menjadi *sulfenic acid* ($R-SO_2H$) yang diakibatkan oleh *hydrogen peroxide* (H_2O_2)³¹. Formasi disulfide juga ditandai dengan disulfide bond dengan cystein kedua yang ada di GPx dibentuk, yang

mengakibatkan terbentuknya *selenol* (RSeH) dan *selenenic acid* (RSeOH) ³¹. *Selenenic acid* akan direduksi menjadi *selenol*, yang dapat disebut sebagai *selenol-selenenic acid intermediat*³². Selenol kemudian diteruskan ke *glutathione* (GSH) dan diubah menjadi GS-SeR. GS-SeR kemudian diubah menjadi *glutathione disulfide* (GS-SG) dan *selenol* dikembalikan ³². *Glutathione disulfide* kemudian direduksi oleh glutathione reductase dan diubah menjadi *glutathione* (GSH) dan NADPH ³².

Mekanisme tersebut memerantarai pengurangan *hydrogen peroxide* dan *lipid hydroperoxides*, yang berguna untuk melindungi biomolekuler dari kerusakan yang diakibatkan oleh ROS³. GPx juga memiliki peranan penting dalam modulasi proses fisiologis, seperti hambatan perpindahan elektron, regulasi seluler, dan pengurangan *hydrogen peroxide* yang diperlukan untuk proses fisiologis ³².

2.2.3. Peran GPx terhadap stres oksidatif

Peningkatan ROS di tubuh dapat disebabkan oleh berbagai faktor, termasuk stres oksidatif akibat radiasi UVB ². Peningkatan ROS yang normal biasanya diimbangi oleh peningkatan aktivitas GPx ³. Namun, jika jumlah ROS melampaui kapasitas antioksidan, ROS akan bereaksi dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) pada membran sel, menghasilkan hidroperoksida ³. Tingginya kadar lipid peroksida ini dapat menyebabkan kerusakan pada organ dan jaringan³.

GPx adalah enzim metabolik antioksidan yang berkaitan dengan ROS intraseluler ³². Peningkatan aktivitas GPx dapat meningkatkan kemampuan tubuh untuk mendegradasi ROS dan mencegah kerusakan yang diakibatkan oleh ROS³. GPx memiliki fungsi utama untuk memecah *hydrogen peroxide* (H₂O₂) dan *hydroperoxide* organik ³. GPx juga memiliki peranan dalam modulasi proses fisiologis, seperti penahanan perpindahan elektron dan regulasi seluler³². GPx bekerja bersama dengan CAT dan SOD dalam proses detoksifikasi H₂O₂ pada jaringan ³.

2.2.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi GPx

Faktor penentu molekuler yang mempengaruhi ekspresi dan fungsi GPx, dengan penekanan pada peran GPx-1 dalam memodulasi stres oksidan seluler dan respons pensinyalan yang dimediasi redoks, dengan mengatur hidroperoksida seluler dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) ³³. GPx-1 dapat melindungi terhadap stres oksidatif, namun, jika berlebihan, GPx-1 juga dapat memiliki efek buruk karena kurangnya oksidan seluler esensial yang mengakibatkan stres reduktif yang ditandai dengan kekurangan oksidan dan/atau kelebihan zat pereduksi ³³. Selain itu lingkungan struktural tersier lokal dan asam amino tambahan sangat penting untuk aktivitas GPx ³³. P53 adalah tumor supression dengan memodulasi apoptosis, penghentian pertumbuhan, Perbaikan DNA, dan penuaan sel sebagai respons terhadap stress seluler. P53 dapat

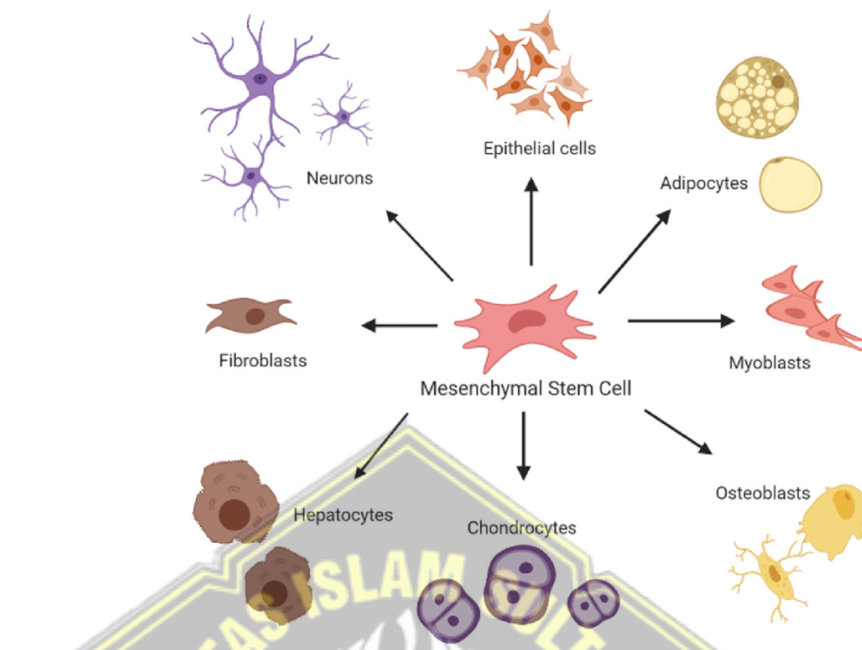
meningkatkan regulasi transkripsi GPx-1 melalui aksinya pada classic p53- consensus binding site ³³. Regulasi GPx melalui cara transkripsional dan pasca-transkripsional juga diatur oleh keberadaan selenium dan kofaktor yang terlibat dalam biosintesis dan penyisipan active-site selenocysteine (Sec) ³³.

Mekanisme oksidatif juga dapat mengatur transkripsi gen GPx-1 melalui situs NFkB dan *situs Aktivator Protein-1* (AP-1) di promotor³³. NFkB juga mengatur ekspresi GPx sebagai respons terhadap estradiol, sebagai penghambat NFkB pada peningkatan regulasi ekspresi GPx yang dimediasi oleh estradiol ³³. Kemampuan estradiol untuk meningkatkan regulasi transkripsi GPx-1 dapat berkontribusi pada peningkatan ekspresi GPx-1 pada wanita dibandingkan pria ³³. Faktor lainnya yang berpengaruh terhadap aktivitas GPx yaitu genetik ³³.

2.3. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)

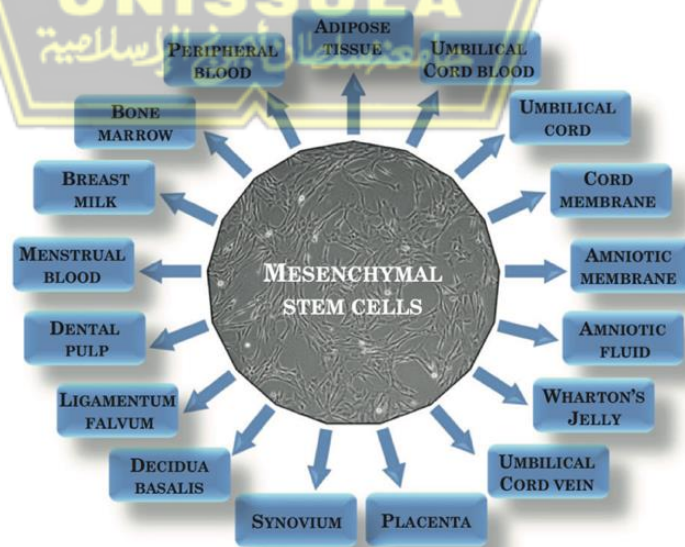
2.3.1. Definisi *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) merupakan jenis sel yang mampu memperbarui diri dan mempertahankan potensi diferensiasi menjadi beragam jenis sel yang spesifik ³⁴. MSCs dapat berdeferensiasi menjadi keratinosit, kondrosit, adiposit, osteosit, keratinosit, miosit dan sel tendon ³⁵.



Gambar 2.1. Kemampuan Diferensiasi dari MSC³⁶

MSCs diperoleh dari sejumlah jaringan, termasuk sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat⁵. Selain itu sumber lainnya MSC dapat ditemukan pada pulpa gigi, ligamen periodontal, tendon, kulit, otot, dan jaringan lainnya⁵.



Gambar 2.2. Mesenchymal Stem Cells (MSCs).⁴

MSC juga ditandai oleh ekspresi permukaan CD penanda, termasuk CD44+, CD73+, CD90 +, dan CD105+, dan dibedakan dari sel hematopoietik oleh kurangnya CD34, CD45, CD14, dan HLA-DR ¹⁶. MSC kemampuan imunomodulator, reparatif, dan regeneratif melalui pensinyalan parakrin, yang memiliki potensi terapi yang besar ¹⁶.

2.3.2. Karakteristik *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)

MSC memiliki beberapa karakteristik utama dalam proses regenerasi suatu jaringan ⁵. Hal ini dikarenakan *stem cell* memiliki kemampuan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi serta mampu untuk menghasilkan berbagai produk seperti faktor pertumbuhan dan sitokin ⁵. *Stem cell* juga mampu berkomunikasi secara parakrin maupun autokrin melalui sitokin yang dihasilkan ³⁴. Kemampuan *stem cell* berkomunikasi secara parakrin yaitu dengan cara menstimulasi pengaktifan sel lain dalam proses penyembuhan ³⁴. *Stem cell* juga memiliki kemampuan untuk *homing* yaitu kemampuan sel untuk menuju organ target sebagai mekanisme awal proses penyembuhan sebelum akhirnya menempel, proliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan ⁵.

Kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan sel membuat MSC menarik secara klinik. Berbagai jurnal penelitian melaporkan MSC terlibat kuat dalam restorasi dan regenerasi berbagai kerusakan dan atau regenerasi jaringan ¹⁶.

2.3.3. Mobilisasi MSC

Hal ini telah ditetapkan bahwa MSC, ketika ditransplantasikan secara sistemik, menunjukkan kemampuan untuk menuju ke lokasi kerusakan jaringan pada hewan coba⁵. Ini menunjukkan bahwa MSC memiliki kemampuan untuk bermigrasi⁵. Reseptor kemokin serta ligannya dan adhesi molekul mempertahankan peranan penting dalam mekanisme *homing* pada jaringan yang spesifik melalui leukosit⁵. Banyak penelitian telah menunjukkan ekspresi fungsional berbagai molekul adhesi dan reseptor kemokin pada MSC manusia³⁴. Memanfaatkan potensi migrasi MSC oleh modulasi interaksi reseptor-kemokin adalah strategi yang berguna untuk meningkatkan kemampuan MSC untuk memperbaiki kelainan bawaan dari jaringan *mesenchymal* atau memfasilitasi perbaikan jaringan *in vivo*³⁴.

Pengekspresian reseptor atau ligan spesifik oleh jaringan yang rusak memfasilitasi peradangan, adhesi, dan infiltrasi MSC ke lokasi cedera³⁴. Terdapat banyak jenis mediator sinyal yaitu VEGF (*vascular endothelial growth factor*), *granulocyte colony stimulating factor* (GCSF), *chemokines*, *erythropoietin* (EPO), *stromal-derived factor-1* (SDF-1), *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), *fibroblast growth factor*, *angiopoietin-2*, *platelet-derived growth factor-CC*, *stem cell factor* (SCF), *placental growth factor* (PlGF), dan interleukin (IL)-8, IL-6, IL-3, IL-2, serta IL-1 β ³⁴.

2.3.4. Konsep *Small Molecule Growth Factor* MSC

MSC, berdasarkan kemampuannya mampu menskresi berbagai *soluble molecule* secara parakrin yaitu komunikasi MSC dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepaskan oleh MSC ³⁷. *Small molecule growth factor* MSC didasarkan pada :

1. Kompleksitas Teknik isolasi MSC

Teknik dan metode mengisolasi MSC memerlukan prosedur yang kompleks, waktu kultur yang lama agar mendapatkan turunan MSC , berbagai faktor yang harus dikendalikan agar didapatkan turunan MSC yang homogen dengan potensi stemness yang tinggi, khususnya kemampuan multi-diferensiasi menjadi berbagai sel jaringan spesifik ³⁸.

2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat

MSC setelah terintegrasi dalam jaringan yang cedera memiliki waktu paruh hidup yang singkat³⁹. Hal ini juga dipengaruhi oleh berbagai faktor internal jaringan yang cedera, sehingga dapat menyebabkan kemampuan regenerasi menjadi lemah ³⁷.

3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi

Pada penelitian didapatkan MSC yang diberikan melalui intravena akan terjebak di paru-paru sebagai emboli kecil (tanpa menyebabkan oklusi vaskuler) ⁵. MSC tersebut tetap akan

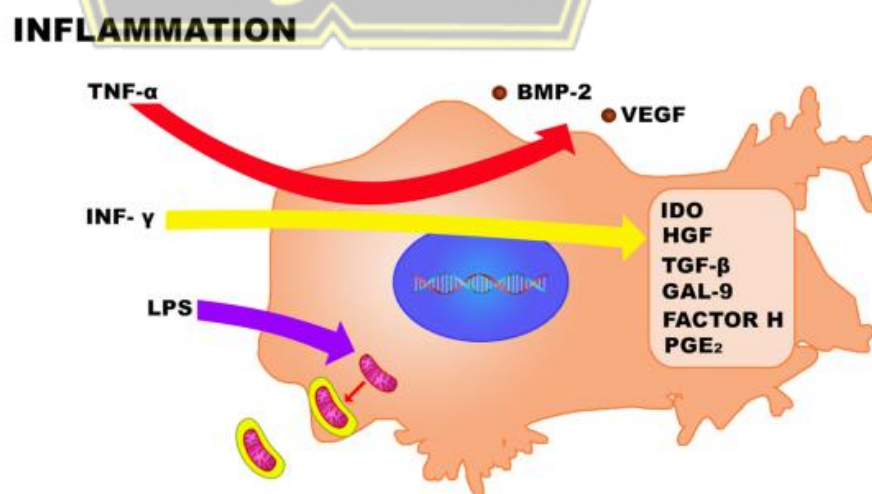
melepaskan berbagai molekul antiinflamasi dan pro-regenerasi ⁵. Atas dasar ini menimbulkan spekulasi bahwa Small molecule MSC yang dilepas secara parakrin merupakan faktor utama dalam regenerasi jaringan ⁵.

2.3.5. Induksi *Small Molecule Growth Factor* MSC

Beberapa penelitian melaporkan bahwa sekresi sel MSC bertanggung jawab atas efek terapeutiknya ⁴⁰. Sekresi ini mencakup molekul dan vesikel ekstraseluler yang memiliki efek lokal dan jauh ⁴⁰. Peran *small molecule growth factor* MSC menjadi sangat penting, sehingga banyak upaya dilakukan untuk menghasilkan *small molecule* ini secara in-vitro ³⁹. Secara spesifik Induksi *small molecule growth factor* MSC yaitu ³⁹:

1. Induksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi

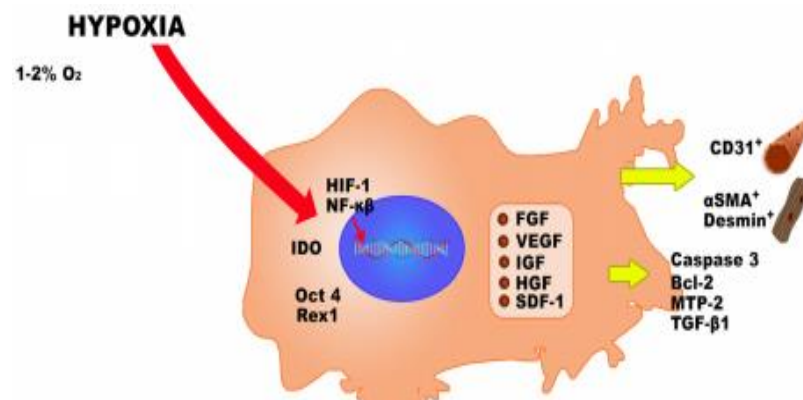
Secara teoritis, MSC yang diaktivasi sebelumnya oleh TNF- α dapat melepas berbagai molekul anti-inflamasi ⁴⁰.



Gambar 2.3. Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC ⁴⁰

2. Induksi MSC dengan teknik hipoksia

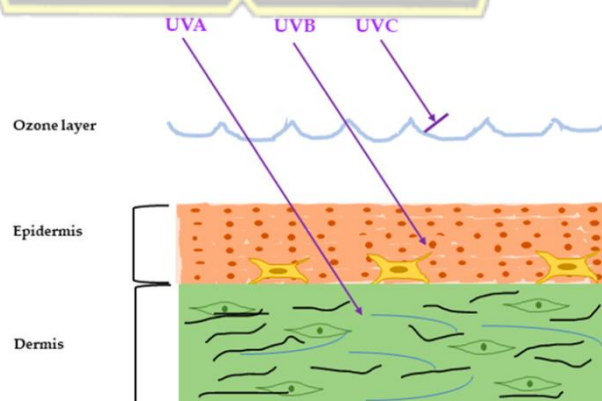
Pada inkubasi, MSC dalam keadaan hipoksia akan melepaskan berbagai macam molekul pro-regenerasi ³⁸. Teori "*hypoxic preactivated MSC-induced soluble molecule*," yaitu berbagai molekul terlarut dalam medium yang dilepaskan oleh MSC yang mengalami hipoksia. ³⁸. Kondisi hipoksia pada MSCs diketahui dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10, serta meningkatkan ekspresi berbagai antioksidan seperti GPx, *superoksida dismutase* (SOD)1, SOD2, katalase (CAT), dan *sirtuin* (SIRT)1 dan 3 ^{17,38}. Produksi IL-10 oleh MSCs dapat menghambat faktor transkripsi *nuclear factor kappa B* yang memicu overekspresi ROS ³⁸. Di sisi lain, berbagai antioksidan yang diekspresikan secara langsung oleh MSCs melalui eksosom, seperti GPx, dapat mengaktivasi faktor transkripsi Nrf2 yang berujung pada peningkatan ekspresi antioksidan ¹⁸.



Gambar 2.4. Lingkungan Hipoksia Mengaktivasi MSC ⁴⁰

2.4. Ultraviolet B (UVB)

Paparan Radiasi ultraviolet diklasifikasikan menjadi tiga jenis menurut panjang gelombangnya yaitu Ultraviolet C (UVC 200-290nm), Ultraviolet B (UVB 290-320nm) dan Ultraviolet A (UVA 320-400nm) ⁴¹. Ozon menyerap 100% UVC, karena penyaringan atmosfer, rasio UVB:UVA yang mencapai tanah adalah 20:1 ⁴¹. UVB sebagian besar diserap di epidermis sedangkan UVA menembus lebih dalam ke lapisan dermis ⁴¹. Radiasi ultraviolet A dan ultraviolet B dapat dengan mudah menembus lapisan epidermis dan dermis kulit. Ketika kulit terpapar sinar matahari, radiasi UV diserap oleh molekul-molekul kulit, menghasilkan senyawa berbahaya yang dikenal sebagai spesies oksigen reaktif (ROS) ⁴². Senyawa ini menyebabkan "kerusakan oksidatif" pada komponen seluler seperti dinding sel, membran lipid, mitokondria, dan DNA ⁴². ROS juga berperan penting dalam jalur molekuler yang merugikan kulit ⁴¹. Kolagen, protein ekstraseluler utama dalam lapisan dermis, memiliki peran penting dalam menjaga elastisitas kulit ⁴¹.



Gambar 2.5. Penetrasi radiasi ultraviolet (UVR) ke dalam kulit.⁴³

2.4.1. Photoaging

Kulit terus menerus terpapar dengan lingkungan luar, baik secara langsung maupun tidak langsung ⁴¹. Penuaan kulit secara umum dapat dibagi menjadi dua, yakni, penuaan intrinsik/penuaan kronologis dan penuaan ekstrinsik/photoaging⁴². Photoaging menyebabkan banyak perubahan histologis pada kulit yang berbeda dengan histologis⁴². Tanda-tanda klinis photoaging meliputi kekeringan, pigmentasi tidak teratur, gelap/terang, warna pudar, atrofi yang parah, dan penampilannya yang kasar ⁴². Tanda-tanda lainnya termasuk elastosis (efek kulit yang kasar, kuning, dan berbatu-batu) dan purpura aktinik (mudah memar berhubungan dengan kerapuhan dinding pembuluh darah di dermis)⁴¹.

Tabel 2.1. Perbandingan Perubahan Histologis Dan Klinis Yang Terbukti Pada Penuaan Kronologis Dan Photoaging⁴²

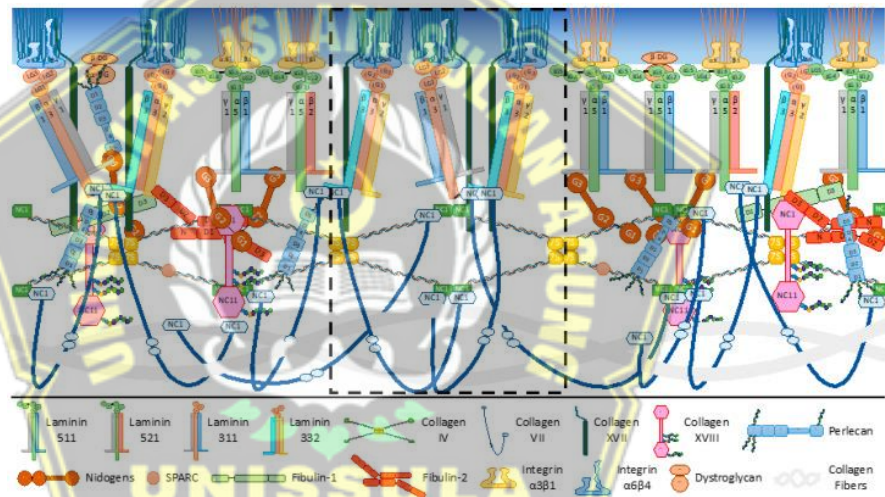
	Chronological aging	Photoaging
Tampak Histologis	Kolagen longgar, pendek, tipis dan tidak teratur Epidermal atrophy Loss of rete pegs Flattening dari epidermal-dermal junction Penurunan melanocytes, Langerhans, and mast cells	Elastosis Fragmentasi kolagen Irregular epidermal thickness Peningkatan glycosaminoglycans and proteoglycans Peningkatan inflammatory markers (mast cells, eosinophils, mononuclear cells) Melanogenesis
Tampak Klinis	Kulit Tipis Kerutan Halus Xerosis Laxity Cherry angioma Keratosis Seboroik	Kulit Atrofi Kerutan Kasar Kulit Kasar Lentigines Bronzed appearance Yellow cobblestone appearance Telangiectasia Bruising Sun-induced dermatitis

Pigmentasi kulit ditentukan oleh kuantitas, jenis dan susunan melanin pada kulit yang menentukan bagaimana tampilan kulit setelah terkena paparan sinar UV ⁴⁴. Pada kulit yang lebih gelap memiliki tingkat perlindungan yang lebih besar terhadap ultraviolet dan memberikan peningkatan resistensi terhadap fotoaging ⁴⁴. Fotoproteksi mengacu pada tindakan yang dapat diambil untuk melindungi kulit dan tabir surya secara luas didefinisikan sebagai agen yang melindungi dari kerusakan akibat sinar UV dan melindungi dari sengatan matahari, kerutan, dan perubahan pigmentasi ⁴¹. Direkomendasikan penggunaan tabir surya yang berspektrum luas (melindungi terhadap UVA dan UVB) ⁴². Sun Protecting Factor (SPF) mengacu pada tingkat perlindungan dari sinar ultraviolet B dan tidak memperhitungkan perlindungan terhadap sinar ultraviolet A sehingga disarankan untuk memilih tabir surya dengan SPF 30 dan memiliki perlindungan terhadap UVA ⁴².

2.4.2. Kolagen

Kolagen adalah makroprotein kompleks yang mengelompokkan 20% –30% dari seluruh protein yang ditemukan pada organisme hidup dan mewakili komponen struktural utama matriks ekstraseluler di semua jaringan ikat (yaitu, kulit, tulang, ligamen, tendon, dan tulang rawan) dan jaringan interstisial organ parenkim ⁴⁵. Ada 28 jenis kolagen berbeda yang diberi nama dengan

angka Romawi (I – XXVIII) dalam urutan kronologis penemuan ⁴⁶. Kolagen umumnya terdiri dari tiga rantai asam amino panjang berbentuk helikoid (sekitar 1050 di setiap heliks) ⁴⁵. Struktur dasar rantai adalah triplet, di mana glisin berikatan dengan dua asam amino lainnya, dan dengan urutan berulang (Gly-X-Y)_n; biasanya, prolin atau hidroksiprolin sering terletak di posisi Y ⁴⁵. Rantai disusun dalam struktur primer, sekunder dan tersier, dengan bentuk akhir fibril ⁴⁵.



Gambar 2.6. Jenis Kolagen pada Kulit ⁴⁷

Kolagen menyumbang 30% dari total kandungan protein tubuh pada manusia ⁴⁸. Berdasarkan arsitektur seratnya, kolagen diklasifikasikan menjadi kolagen pembentuk fibril, kolagen penjangkaran, kolagen pembentuk jaringan, kolagen transmembran, dan fibril-associated collagens with interrupted triple helices (FACIT) ⁴⁸. Kolagen Tipe I, II, III, V, dan IX, dikenal sebagai kolagen pembentuk fibril yang tersusun menjadi fibril raksasa ⁴⁸. Kolagen Tipe IV menciptakan jaringan yang saling terkait

di membran dasar, tipe VI membentuk mikrofibril, dan tipe VII membentuk fibril penjangkaran ⁴⁸. Kolagen FACIT tipe IX, XII, XIV, XIX, XX, dan XXI dihubungkan dengan serat kolagen yang lebih besar, yang berfungsi sebagai jembatan molekuler untuk mendukung organisasi extracellular matrix (ECM) ⁴⁸.

Pada kulit, kolagen tipe I merupakan 80–85% dari ECM dermal, sedangkan kolagen tipe III merupakan sekitar 8–11% ⁴⁸. Kombinasi kedua kolagen ini membentuk dasar serat struktural penyusun dermis ⁴⁸. Kolagen tipe IV membentuk jaringan dan spesifik pada dermal-epidermal Junction (DEJ) dan dinding pembuluh darah ⁴⁹. Ini memainkan peran penting dalam DEJ, di mana ia bekerja sama dengan kolagen fibrilar tipe VII untuk memastikan kohesi dan struktur DEJ ⁴⁶. Sementara itu, kolagen transmembran tipe XVII memungkinkan koneksi optimal antara struktur intraseluler dan ekstraseluler yang terlibat dalam adhesi epidermis ke DEJ ⁴⁷. Demikian pula, kolagen tipe VI memungkinkan pengikatan antara berbagai komponen matriks ekstraseluler dermis dan DEJ , memastikan konsistensinya dengan dermis ⁴⁹.

Dalam penyembuhan luka akibat radiasi UV, kolagen ini disintesis oleh sel-sel seperti fibroblas dan dimodifikasi menjadi morfologi yang kompleks ⁵⁰. Tindakan enzim proteolitik pada berbagai tahap proses penyembuhan luka memandu remodeling jaringan yang diperbaiki ⁵⁰. Dua enzim penting adalah matriks

metalloproteinase (MMPs) dan serin protease ⁴⁶. Di antara MMP, kolagenase dan gelatinase, yang masing-masing mendegradasi kolagen fibrilar utuh dan rusak, merupakan kunci pergantian kolagen selama penyembuhan luka⁵⁰. Kolagen I dan III secara istimewa dipecah oleh MMP-1 (juga disebut kolagenase-1) dan MMP-8 (kolagenase-2) sedangkan kolagen IV didegradasi oleh gelatinase MMP-9 ⁵⁰. Penelitian ekstensif telah menentukan bahwa enzim kolagenolitik dapat mengenali, mengikat, melepaskan dan membelah untaian individu dari triple helix ⁵⁰. MMP berperan dalam proses fisiologis, seperti perkembangan dan perbaikan jaringan, serta dalam proses patologis seperti tumorigenesis dan metastasis ⁴⁷. Selain itu, MMP juga berkontribusi pada pelepasan fragmen bioaktif (dikenal sebagai matricryptin), seperti endostatin dan tumstatin, dari kolagen utuh⁵⁰.

2.5. Pengaruh H-MSCs terhadap Ekspresi Nrf2 dan GPx Tikus Model Collagen Loss yang dipapar UVB

MSCs prekondisi hipoksia mensekresikan sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan vesikel ekstraseluler mengandung berbagai macam antioksidan, seperti GPx, *superoxide dysmuthase* (SOD)1, SOD2, *catalase* (CAT) dan sirtuin (SIRT)1 dan 3 ^{17,51}. Produksi IL-10 oleh MSCs dapat menghambat faktor transkripsi NFκB yang merupakan pemicu overekspresi ROS ⁵². Sisi lain, berbagai macam antioksidan yang diekspresikan secara langsung oleh MSCs melalui eksosom, seperti GPx mampu mengaktivasi

faktor transkripsi Nrf2 yang berujung pada peningkatan ekspresi antioksidan, seperti GPx2¹⁸.

Penyebab utama cedera kulit adalah stres oksidatif, yang dipicu oleh paparan sinar ultraviolet¹. Stres ini menyebabkan produksi ROS yang kemudian merusak protein, lipid, dan DNA dalam sel kulit⁴². Selain itu, mengurangi fungsi enzim antioksidan¹. Dampaknya meliputi percepatan penuaan, dan peningkatan kerentanan terhadap karsinogenesis⁵³. Jalur pensinyalan NFkB berperan krusial dalam respons terhadap pembentukan ROS yang dipicu oleh UVB di kulit⁵². Paparan UVB memicu respon sinyal inflamasi dengan mengaktifkan faktor transkripsi NF-κB, yang selanjutnya meningkatkan produksi ROS serta sitokin proinflamasi⁵². ROS secara normal mampu mengaktivasi pathway Nrf2 untuk memproduksi berbagai enzim antioksidan, termasuk GPx *intraseluler*, sehingga kondisi sel dapat kembali homeostasis². Namun, paparan UVB yang berlebih berdampak pada ketidakseimbangan kadar ROS dan antioksidan *intraseluler* sehingga berujung pada *photoaging* dan *collagen loss*¹.

Sinyal dari ROS dan elektrofil adalah molekul reaktif yang dihasilkan selama stres oksidatif dan mereka dapat menyebabkan kerusakan sel jika tidak dikendalikan⁴². Paparan sinar UVB dapat menghasilkan ROS yang menginduksi ekspresi *TNFR1-associated death domain* (TRADD)⁵⁴. Ketika TRADD diaktifkan maka dapat berikatan dengan reseptor Tumor Necrosis Factor (TNF)⁵⁴. Selain itu UVB juga dapat menyebabkan kerusakan yang diidentitaskan oleh *T-cell receptor* (TLR) yang kemudian

mengaktifkan *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88)⁵⁴. Aktivasi MyD88 akan merekrut dan mengaktifkan *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK) yang membuat *TGF- β -activated kinase 1* (TAK1) juga teraktivasi dan mengaktifkan IKK (IkB kinase) menyebabkan degradasi IkB dan pelepasan NF- κ B ke dalam nukleus⁵⁴. Peningkatan ROS akibat paparan UVB akan mengaktifkan IKK yang kemudian mengaktifkan NF- κ B dan menginduksi gen pro-inflamasi dan molekul pensinyalan lainnya⁵⁴. Nrf2 berada dalam keadaan tidak aktif dan terletak di sitoplasma, di mana ia berikatan dengan protein repressor bernama *Kelch-Like ECH Association Protein 1* (Keap1) yang berperan sebagai penjaga Nrf2 memasuki nukleus dan memicu ekspresi gen antioksidan²⁵. Keap1 terdiri dari beberapa residu sistein yang bertindak sebagai sensor terhadap status redoks yang merespon peningkatan ROS dan elektrofil, hasil dari oksidasi Keap1, Nrf2 terlepas dari kompleks Nrf2-Keap1²⁸. Perlepasan ini mencegah degradasi Nrf2 oleh proteasom dan memungkinkan Nrf2 untuk berpindah ke nukleus²⁸. Nrf2 di dalam nukleus kemudian mengikat sekuens regulator yang disebut *Antioxidant Response Element* atau *Electrophile Response Elements* (ARE/EpRE). ARE/EpRE adalah sekuens pendek yang terletak di wilayah promotor gen²⁸. Nrf2 dan HIF2 selalu bekerja secara sinergis dan juga Nrf2 dapat meningkatkan stabilitas dan aktivitas HIF2 selain itu aktivasi Nrf2 juga dapat berinteraksi dengan P53²⁷. Jalur aktivasi P53 dapat menginduksi ekspresi enzim GPx melalui aktivasi mTOR sehingga menyebabkan P53 terasetilasi yang dapat menyebabkan GPx

terekspresi ⁵⁵. Proses ini juga diperkuat oleh pembentukan heterodimer antara Nrf2 dan faktor transkripsi lainnya, seperti s-Maf, yang terdapat dalam nukleus. Mekanisme tersebut berujung pada peningkatan transkripsi berbagai antioksidan seperti GPx, CAT, SOD dan HO-1 ².

Kadar GPx yang diproduksi oleh H-MSCs di dalam vesikel mampu secara langsung memecah ROS pada sel kulit akibat paparan UVB ². Proses dimulai ketika hydrogen peroxide (H_2O_2) yang merupakan salah satu jenis ROS dan bereaksi dengan residu sistein (Cys) pada enzim GPx. Residu sistein ini sangat reaktif terhadap oksidasi. Akibat dari reaksi ini, sistein mengalami oksidasi, dan gugus tiol (-SH) pada sistein berubah menjadi asam sulfonat (R-SOH). Ini merupakan tahap pertama dalam oksidasi sistein ³¹. Pembentukan disulfide juga terjadi dengan adanya ikatan disulfide bond antara *cystein* kedua yang ada di GPx, menghasilkan (RSeH) dan *selenenic acid* (RSeOH) ³¹. Selenenic acid ini kemudian dapat mengalami interaksi lebih lanjut, membentuk *selenol-selenenic acid intermediat* ³². *Selenol* (RSeH) kemudian berinteraksi dengan *Glutathione* (GSH), yang merupakan tripeptida penting dalam sistem antioksidan seluler ³². Selenol mentransfer elektron ke GSH, membentuk kompleks GS-SeR (Glutathione-Selenosistein) ³². GS-SeR kemudian dikonversi menjadi glutathione disulfide (GS-SG) sambil mengembalikan selenosistein pada GPX ke bentuk selenolnya ³². *Glutathione disulfide* (GS-SG), yang merupakan bentuk teroksidasi dari GSH, kemudian direduksi kembali menjadi dua

molekul GSH oleh enzim Glutathione Reductase dan proses ini membutuhkan NADPH sebagai donor elektron ³².



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

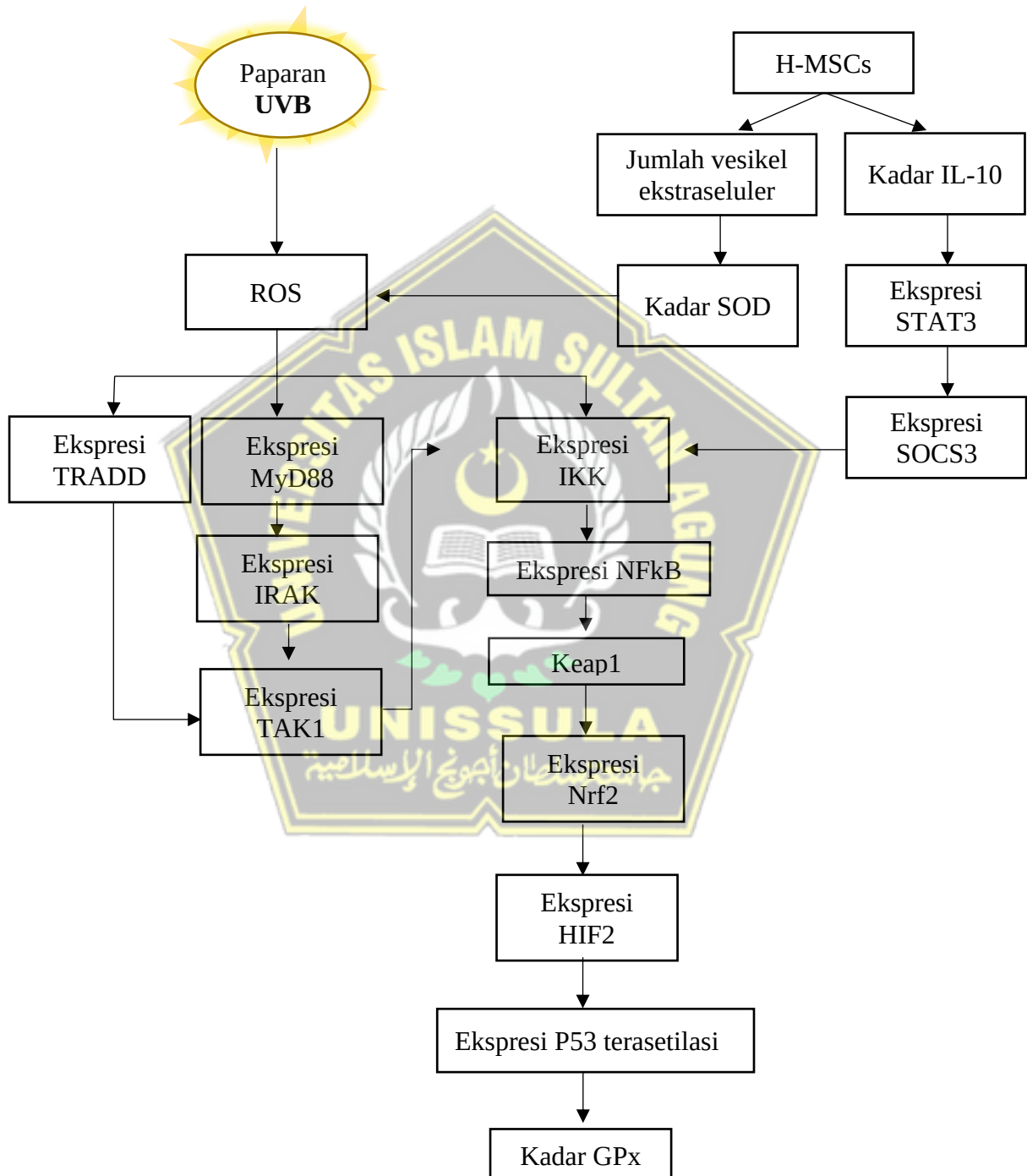
3.1. Kerangka Teori

Paparan radiasi UVB bisa menyebabkan penuaan dini pada kulit (*photoaging*) dan penurunan kadar kolagen di lapisan dermis¹. Mekanisme molekuler yang berperan dalam penuaan kulit akibat paparan UVB meliputi kerusakan DNA, pembentukan ROS, dan terjadinya peradangan⁵². Jalur sinyal NFκB memainkan peran penting dalam merespons pembentukan ROS yang disebabkan oleh UVB pada kulit, ROS ini dapat merusak komponen seluler, termasuk DNA, protein, dan lipid, serta berperan sebagai sinyal untuk berbagai jalur molekuler⁵². Paparan UVB memicu peningkatan ROS yang dapat mengaktifkan protein adaptor seperti TRADD dan MyD88⁵⁴. Setelah MyD88 diaktifkan, MyD88 merekrut dan mengaktifkan protein kinase terkait reseptor interleukin-1, yang dikenal sebagai IRAK⁵⁴. Aktivasi IRAK adalah langkah awal penting dalam sinyal downstream dari MyD88⁵⁴. Ketika IRAK diaktifkan, TAK1 juga teraktivasi, yang pada gilirannya mengaktifkan IKK (IκB kinase) yang menyebabkan degradasi IκB dan pelepasan NF-κB ke dalam nukleus⁵⁴. Ini menginduksi ekspresi gen pro-inflamasi, seperti sitokin dan kemokin⁵⁴. Aktivasi adaptor ini menginisiasi kaskade sinyal melibatkan kinase spesifik seperti *IκB kinase* (IKK)⁵⁴. IKK kemudian memfosforilasi IκB, menyebabkan degradasinya dan pelepasan NF-κB⁵⁴. Setelah terlepas, NF-κB berpindah ke nukleus dan mengaktifkan transkripsi gen-gen yang terkait dengan respons inflamasi, termasuk sitokin

proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6⁵². Secara normal, dalam menghadapi peningkatan ROS, jalur Nrf2 diaktifkan sebagai respons adaptif²⁵. Nrf2 dilepaskan dari KEAP1, Nrf2 dan HIF2 bekerja secara sinergis di bawah kondisi hypoxia²⁷. Nrf2 dapat meningkatkan stabilitas dan aktivitas HIF2²⁷. Dalam kondisi stres oksidatif, aktivasi Nrf2 dapat berinteraksi dengan P53, memperkuat respon antioksidan dan membantu dalam perbaikan sel⁵⁶. Aktivasi p53 yang terasetilasi dapat menekan stress oksidatif intraseluler dan stres oksidatif yang diinduksi secara kimiawi seperti akibat paparan UVB dengan menginduksi kadar GPx⁵⁶. Nrf2 menginduksi ekspresi GPx sebagai bagian dari respon antioksidan terhadap stres oksidatif². Peningkatan GPx membantu mengurangi ROS². Namun, paparan UVB yang berlebihan menyebabkan ketidakseimbangan antara kadar ROS dan antioksidan intraseluler¹. Ketika produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan, termasuk GPx, terjadi ketidakseimbangan redoks yang mengarah pada stres oksidatif yang akhirnya mengakibatkan photoaging dan kehilangan kolagen¹.

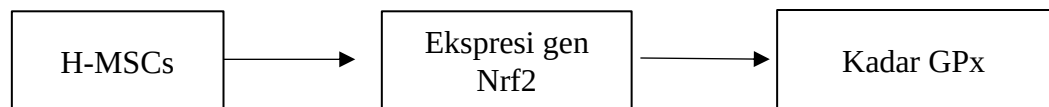
MSCs saat diprekondisi hipoksia mampu meningkatkan sekresi vesikel intraseluler atau eksosom yang mengandung berbagai enzim antioksidan, termasuk GPx, disamping juga meningkatkan kemampuan anti-inflamasinya dengan mengekspresikan kadar IL-10 dalam jumlah yang tinggi⁵¹. GPx mampu secara langsung menetralkan ROS menjadi H₂O³. Sisi lain, IL-10 mampu menurunkan kadar ROS melalui penghambatan NF κ B pathway via *Supressor of Cytokine Signalling-3* (SOCS3)³.

Mekanisme tersebut berujung pada penurunan kadar ROS intraseluler dan regulasi homeostasis ROS dengan GPx, yang berujung pada hambatan *photoaging* dan peningkatan persentase kolagen pada kulit ³².



Gambar 3.1. Kerangka Teori Penelitian

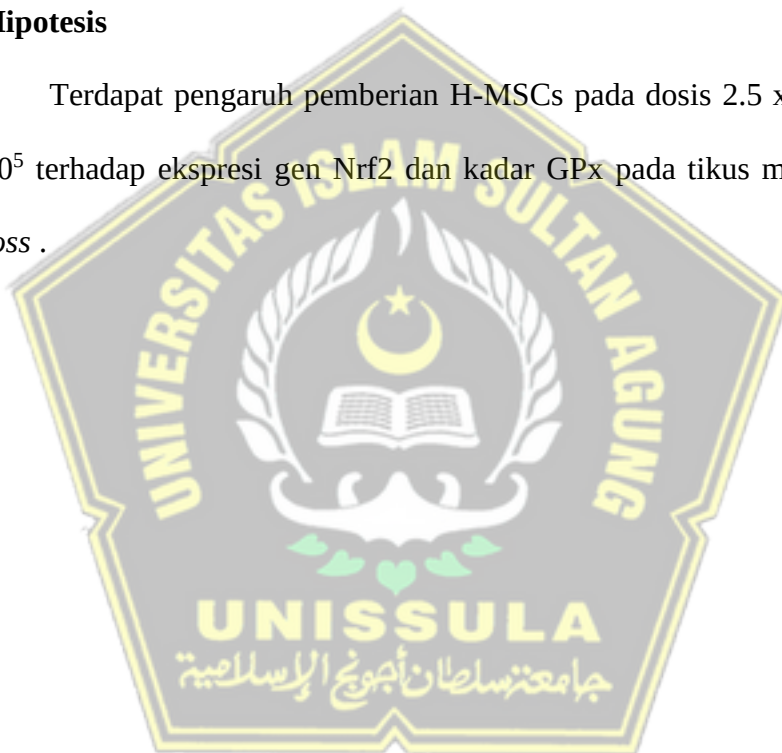
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep Penelitian

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian H-MSCs pada dosis 2.5×10^5 dan 5×10^5 terhadap ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx pada tikus model *collagen loss*.

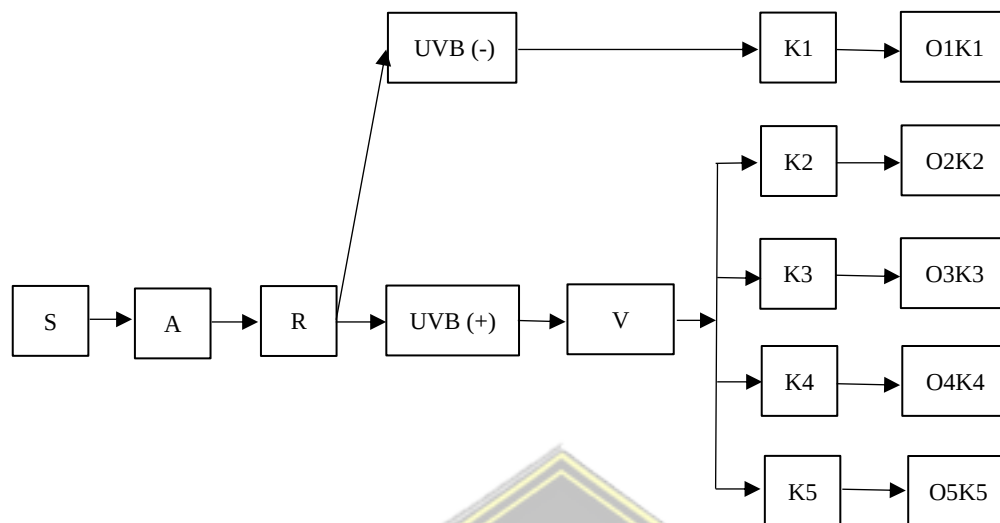


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental menggunakan design penelitian berupa *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan tiap perlakuan. Subjek penelitian adalah tikus jantan galur *Wistar (Rattus norvegicus)* dengan bobot badan 220 ± 250 g. Perlakuan pada penelitian ini terdapat 5 kelompok. Kelompok 1 adalah kelompok tikus sehat yang tidak diberi perlakuan. Kelompok 2 adalah kelompok kontrol negatif dimana tikus dipapar UV-B dan diberi 200 μ L NaCl. Kelompok 3 adalah kelompok kontrol positif dimana tikus dipapar UV-B dan diberi 200 μ L *hyaluronic acid* (HA). Kelompok 4 adalah Kelompok perlakuan 1 dimana tikus dipapar UV-B dan diberi H-MSCs dosis 2.5×10^5 dalam 200 μ L NaCl. Kelompok 5 adalah Kelompok perlakuan 2 dimana tikus dipapar UV-B dan diberi H-MSCs dosis 5×10^5 dalam 200 μ L NaCl.



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Sampel
 A : Aklimasi
 R : Randomisasi menjadi 4 kelompok
 UVB : Ultraviolet B
 V : Validasi
 K1 : Kelompok tikus sehat yang tidak diberi perlakuan
 K2 : Kelompok Kontrol negatif (Tikus model collagen loss diberi 200 μ L NaCl)
 K3 : Kelompok Kontrol positif (Tikus model collagen loss diberi 200 μ L hyaluronic acid (HA))
 K4 : Kelompok Perlakuan 1 (Tikus model collagen loss diberi H-MSCs dosis 2.5×10^5 dalam 200 μ L NaCl)
 K5 : Kelompok Perlakuan 2 (Tikus model collagen loss diberi H-MSCs dosis 5×10^5 dalam 200 μ L NaCl).
 O1K1 : Observasi Kelompok 1 (kelompok tikus sehat)
 O2K2 : Observasi Kelompok 2 (kelompok Kontrol Negatif)
 O3K3 : Observasi Kelompok 3 (kelompok Kontrol Positif)
 O4K4 : Observasi Kelompok 4 (kelompok Perlakuan 1)
 O5K5 : Observasi Kelompok 5 (kelompok Perlakuan 2)

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah H-MSC dosis 2.5×10^5 dan 5×10^5 dalam 200 μL NaCl.

4.2.1.2. Variabel Antara

Variabel antara penelitian ini adalah ekspresi gen Nrf2.

4.2.1.3. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah kadar GPx.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. H-MSCs

H-MSCs adalah MSCs yang diberlakukan prekondisi hipoksia 5% selama 24 jam. Dosis H-MSCs yang digunakan adalah 2.5×10^5 sel (P1) dan 5×10^5 sel (P2) dalam 200 μL NaCl secara subkutan. H-MSCs di administrasikan pada hari ke-15. Unit : Sel per mikroliter (sel/ μL), Skala : Rasio.

4.2.2.2. Ekspresi Nrf2

Ekspresi Nrf2 adalah jumlah ekspresi relatif mRNA Nrf2 yang diproduksi jaringan kulit pada sampel penelitian. Ekspresi Nrf2 dianalisis pada hari ke-22 menggunakan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Unit : mutiple (x), Skala : Rasio.

4.2.2.3. Kadar GPx

Kadar GPx adalah jumlah absolut protein GPx yang terkandung dalam jaringan kulit pada sampel penelitian. Ekspresi GPx dianalisis pada hari ke-22 menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Unit : Picogram per mikroliter (pg/ μ L), Skala : Rasio.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* dengan usia 2-3 bulan dan bobot badan 220 ± 250 g yang dinyatakan layak dan digunakan sebagai penelitian oleh dokter hewan dari SCCR *Animal Model Research Center*, Semarang. Subjek penelitian mempunyai persen kolagen pada kulit yang rendah setelah pemeriksaan *Masson Trichrome Staining*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel dalam penelitian ini adalah tikus jantan putih galur *Wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Usia 2-3 bulan;
2. Tikus dengan kondisi *collagen loss*, ditandai dengan persen kolagen yang rendah setelah pemeriksaan *Masson Trichrome Staining*.

3. Bobot badan 220 ± 250 gram.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel penelitian adalah tikus jantan putih galur *Wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tikus yang sakit sebelum masa penelitian.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Kriteria *drop out* sampel penelitian adalah tikus jantan putih galur *Wistar* yang mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan menggunakan teknik *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus sehat (tidak diberi perlakuan), KN (dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi $200 \mu\text{L NaCl}$), KP (dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi $200 \mu\text{L HA}$) P1 (dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi H-MSCs dosis 2.5×10^5 dalam $200 \mu\text{L NaCl}$), dan P2 (dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan

diberi H-MSCs dosis 5×10^5 dalam 200 μL NaCl). Pengambilan sampel jaringan kulit untuk validasi dan observasi dilakukan satu kali pada satu tikus di hari ke 14 setelah paparan UVB dan hari ke 21 setelah treatment H-MSCs. Jaringan kulit disimpan dalam buffer formalin 10% dan suhu normal untuk pemeriksaan *masson trichrome staining*, suhu -80°C untuk pemeriksaan ELISA intraseluler dan RNA later dalam suhu 4°C untuk pemeriksaan qRT-PCR.

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel minimal untuk memenuhi kriteria *federer*, diperlukan minimal 3 ekor per kelompok, sehingga total minimal sampel dalam penelitian ini adalah 25 ekor tikus wistar. Penghitungan jumlah sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini, dilakukan menggunakan rumus *Federer* untuk desain eksperimen sebagai berikut:

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 4.75 \rightarrow 5$$

keterangan :

t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah sampel setiap perlakuan

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Dalam penelitian ini alat yang digunakan adalah *Micropipette*

with tip (blue tip, yellow tip, pink tip), pippete filler, conical tube 15ml dan 50 ml, minor set, cryotube 1 ml, haemocytometer, inverted microscope, CO₂ cylinder, 96 well plate, N₂ cylinder scissor, pinset, scalpel, bistouri, spuit berbagai ukuran, thermostirrer, sentrifuse dingin (Thermo, USA), pot jaringan, gelas beker, flask T75 (Corning, Life Sciences, USA), aluminium foil, disk, well plate, hot plate, hotplate stirrer, dissposable pipet, heparin tube (BD Vacutainer, Oxford, UK), conical tube, haemocytometer, cell counter, biosafety cabinet Class 2, CO₂ incubator (Thermo, USA), hypoxia chamber, tempat penyimpanan sampel (refrigerator) dengan temperatur -20°C dan -80°C, mikroskop inverted (Carl Zeiss Inc, Göttingen, Germany), BD FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), optilab, decloaking chamber (Biogear), Illumina's Eco Real-Time PCR System, spinner, fluorometer Quantus (Promega, Madison, WI, USA), slide Poly-L-Lysine Coated (Biogear).

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk analisis dan pembuatan model diantaranya adalah ELISA kit GPx (eLabscience, USA), Starr Trek Universal HRP Detection Kit (STUHRP700Hkit, Biocare Medical), Masson's trichrome stain Kit (Bio-Optica Milano S.p.A), FavorPrep Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Ping-Tung, Taiwan), cDNA sintesis KIT (Sigma, St. Louis, MO, USA), Kappa SYBR Fast Master Mix 2× (KAPA Biosystem, KK4600),

Streptozotocin (Sigma, USA), buffer sitrat (Biogear), primer forward dan reverse Nrf2 dan β -actin.

Bahan untuk isolasi MSCs diantaranya adalah umbilical cord tikus, DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), fungizon 1%, tripan blue (Sigma, St. Louis, MO, USA), NaCl 0,9%, PBS (Phospat Buffer Salin) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), tripsin (Sigma, St. Louis, MO, USA), Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO, USA) alkohol 70%, 80%, 95% dan 100% (Merck-Millipore, Australia), medium alfa MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), streptomisin-penisilin 1% (penstrep) dan xylol (Merck-Millipore, Australia), PBS (Phospat Buffer Salin) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Bahan yang digunakan sebagai validasi MSCs adalah Anti- Rat CD90 PerCP (eBioscience, San Diego CA), Anti- Rat CD29 Alexa Fluor 647 (eBioscience, San Diego CA), Anti-Rat CD31 PE (eBioscience, San Diego CA), dan Anti-Rat CD45 FITC (eBioscience, San Diego CA), Media Basal Diferensiasi Osteogenik MesenCult™ (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), Media Basal Diferensiasi Adipogenik MesenCult™ (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), Oil Red O (Sigma, St. Louis, MO, USA) dan Alizarin Red (Sigma, St. Louis, MO, USA).

4.5. Prosedur Pelaksanaan Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian akan diajukan di Komite Etik

Penelitian Universitas Islam Sultan Agung, Semarang.

4.5.2. Induksi *Collagen Loss*

Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dilakukan pemotongan rambut pada bagian dorsal hingga bersih. Tikus yang telah dibersihkan bagian dorsalnya dimasukkan ke dalam UV *chamber*. Tikus kemudian disinari dengan dipapar UVB dosis 160 mJ/cm² dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu untuk menginduksi *collagen loss*.

4.5.3. Isolasi MSCs dari *Umbilical Cord* (UC)

Proses isolasi dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2* dengan menggunakan peralatan yang telah disterilisasi serta dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi. Tikus bunting usia 21 hari disuntik anestesi dengan menggunakan anestesi dosis lethal dengan injeksi intraperitoneal 10 mL cocktail digunakan Ketamine 50 mg/kgBB, Acepromazine 2 mg/kgBB dan Xylazine 10 mg/kgBB, kemudian dilakukan monitoring tikus dengan pemeriksaan reflek akral, frekuensi nafas dan jantung, apabila tidak ada reflek, maka tikus benar benar sudah tidak bernyawa. Setelah dipastikan tikus tidak bernyawa kemudian dicukur bagian abdominal, kemudian dilakukan laporotomi dan diambil janin yang ada dalam perut tikus, kemudian janin dimasukkan dalam medium transfer dan selanjutnya dibawa kedalam laboratorium untuk dilakukan isolasi, semua proses dilakukan secara steril.

Umbilical cord selanjutnya dikumpulkan dan disimpan kedalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%. Dengan menggunakan pinset, letakkan *umbilical cord* ke petri dish, cuci sampai bersih dengan PBS (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), jaringan tersebut dipotong kecil-kecil (3-5cm) menggunakan bisturi steril, pembuluh darah pada potongan *umbilical cord* dibuang untuk mengurangi kontaminasi, kemudian potongan *umbilical cord* atau eksplan dipindahkan ke cawan petri yang bersih. Tiap potongan *umbilical cord* dihancurkan dengan gunting mata tajam atau bisturi menjadi potongan yang lebih kecil (1mm), lalu tempatkan pada cawan kultur jaringan atau flask T75 dengan susunan titik-titik yang tersebar rata pada flask T75 (Corning, Life Sciences, USA), diamkan selama 3 menit hingga eksplan melekat. kemudian ditambahkan medium komplet yang terdiri dari DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), fungizon, penstrep (antibiotic), dan 10% Fetal bouvine serum (FBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan kurang lebih 3 mL. kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37⁰ C dan 5% CO₂.

Pengamatan sel dilakuan setiap 24 jam untuk melihat ada sel yang keluar dari penanaman *explan* (kira-kira 14 hari akan muncul sel dari *explan*) menggunakan mikroskop inverted. Medium diganti setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium menggunakan *micropipette* diganti dengan *fresh medium* komplet

sebanyak yang dibuang. Setelah sel muncul dari *explan*, tambahkan medium komplit menjadi 5 mL. Setelah 24-72 jam dari munculnya sel *explan*, sel yang mengapung di pindahkan ke cawan petri jaringan yang baru dengan cara ambil semua medium dan masukkan ke *conical tube* 15ml, kemudian lakukan sentrifugasi 1500 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan resuspensi pelet dengan medium komplit. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluen 80%.

4.5.4. Pemanenan dan Penghitungan MSCs

Proses pemanenan sel dilakukan menggunakan tripsin 1 ml (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) untuk memisahkan antara medium dengan sel dan diinkubasi selama kurang lebih 3 menit pada suhu 37°C di dalam incubator, kemudian diberi medium inaktivasi. Sel diamati dengan mikroskop inverted untuk memastikan sel sudah terlepas, apabila sel sudah terlepas, dengan menggunakan *micropipette* tripsin dan PBS diambil, kemudian medium tersebut diganti dengan medium komplit. Sel dipanen apabila mencapai konfluen 80% dipanen.

Penghitungan sel dilakukan dengan mengambil 10 µl sel dan dimasukkan kedalam cryotube menggunakan pipet, kemudian ditambahkan tripan blue (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 90µl ke dalam cryotube, selanjutnya ambil 10µL dan masukkan pada bilik hitung (*hemocytometer*) yang ditutup dengan deck Glass, kemudian

diamati menggunakan mikroskop inverted (Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany). Hitung jumlah sel pada 4 bilik dengan menggunakan rumus berikut:

$$\frac{\sum n}{4} \times 4^2 \times \text{Pengenceran}$$

4.5.5. Validasi MSCs

4.5.5.1. Immunophenotyping dengan menggunakan *Flow Cytometry*

Identifikasi *immunophenotype* MSC tikus dilakukan dengan mengamati ekspresi CD31, CD29, CD90 dan CD45, dengan menggunakan *flowcytometry*. Sel yang telah dilepaskan dari flask menggunakan tripsin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) atau dengan larutan *detachment* lainnya. Kemudian, sel dengan konsentrasi 1×10^7 sel/mL dicuci dan diresuspensi menggunakan BD Pharmingen™ Stain Buffer (nomor katalog 554656), PBS tripsin 1 ml (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Jika jumlah sel terbatas, sel dapat diresuspensi dengan konsentrasi 5×10^6 sel/mL. Tabung falcon 5 ml disiapkan dengan menambahkan reagen sesuai Tabel 3.1.

Prosedur pada tabung 5 sampai 7 diulangi untuk setiap penambahan sampel yang akan dianalisis. Ambil sampel sebanyak 100 µl kemudian dimasukkan kedalam tabung untuk dilakukan *vortex* atau *tapping*. Sel selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dengan

kondisi gelap, lalu dicuci dua kali dengan *stain buffer* (PBS) dan diresuspensi dalam 300-500 μl *stain buffer* (PBS) atau dengan satu kali *washing buffer* (FBS). Tabung 1 - 5 digunakan sebagai kontrol untuk set up cytometry (kompensasi) pada pembacaan analisis *flow cytometry*.

Tabel 3.1. Reagen yang digunakan dalam analisis *flow cytometry*

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC mouse anti-human CD29	5 μl
2	PE mouse anti-human CD44	5 μl
3	PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD45	5 μl
4	APC Mouse anti-human CD31	5 μl
5	Kosong	-
6	hMSC positive isotype control cocktail	20 μl
	hMSC negative isotype control cocktail	20 μl
7	hMSC positive cocktail	20 μl
	PE hMSC negative cocktail	20 μl

4.5.5.2. Uji Diferensiasi MSCs

Sel MSC dikultur dengan kepadatan 2×10^4 sel per sumur pada 24 well plate menggunakan media standar yang terdiri dari DMEM, 10% FBS, dan 1% penisilin (100 U/mL) serta streptomisin (100 $\mu\text{g/mL}$) dengan suhu 37°C , 5% CO_2 dan kelembapan $\geq 95\%$. Ketika konfluensi mencapai 80%, maka media standar akan diganti dengan media diferensiasi osteogenik, terdiri dari Media Basal Diferensiasi Osteogenik MesenCult™ (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) dengan ditambahkan 20% Suplemen Diferensiasi Osteogenik

MesenCult™ 5X (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) dan 1% L-Glutamine (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Media diferensiasi akan diperbarui setiap 3 hari. Setelah kurang lebih selama 21 hari pembentukan matriks tulang, diferensiasi osteogenik dapat divisualisasikan dengan pewarnaan menggunakan 1 mL larutan Alizarin Red 2% (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Prosedur pada uji diferensiasi adipogenik serupa, dengan media kultur hanya saja diganti menjadi Basal Diferensiasi Adipogenik MesenCult™ (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) dengan menambahkan 20% Suplemen Diferensiasi Adipogenik MesenCult™ 5X (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) dan 1% L-Glutamine (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Media diferensiasi akan diperbarui setiap 3 hari kurang lebih selama 30 hari, dan diferensiasi adipogenik dapat divisualisasikan dengan pewarnaan menggunakan Oil Red O.

4.5.6. Proses Hipoksia

MSCs yang telah mencapai batas 80% konfluensi ditambahkan medium lain yaitu medium komplit hingga 10 mL. MSCs di dalam flask selanjutnya akan dimasukkan kedalam hipoksia *chamber*. Gas *Nitrogen* (N₂) dialirkan melalui katup masuk, sementara sensor

oksigen (O_2) dipasang di lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen dalam chamber. Aliran N_2 ditingkatkan sampai indikator menunjukkan bahwa konsentrasi oksigen telah mencapai 5%. Setelah itu, chamber yang berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. MSCs kemudian dipanen dan dipindahkan ke dalam spuit 1 cc dengan media pembawa berupa 200 μL larutan NaCl.

4.5.7. Perlakuan pada Hewan Coba

Tikus ditreatment H-MSCs dosis 2.5×10^5 dan 5×10^5 sel dalam 200 μL NaCl secara subkutan pada hari ke 15 setelah induksi UVB. Tikus kemudian diamati secara makroskopis pada hari ke 21 dan didokumentasi. Tikus kemudian dilakukan terminasi setelah pengamatan untuk pemeriksaan parameter uji.

4.5.8. Uji Ekspresi Nrf2

4.5.8.1. Isolasi dan Analisis Konsentrasi dan Kemurnian RNA

Sampel Kulit

Sampel kulit diambil sebanyak 100 mg, dipotong kecil-kecil dan halus, kemudian dimasukkan ke dalam tabung 5 ml. Sampel kulit diberi Trireagent 1 mL dan dilakukan proses ultrasonikator selama 1 menit. Sampel kemudian diinkubasi di suhu kamar selama 5 menit. Kloroform sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke sampel, kemudian sampel ditutup dan dihomogenisasi menggunakan vortex dengan kecepatan tinggi selama 10 detik. Sampel

tersebut selanjutnya diinkubasi selama kurang lebih 3 menit pada suhu kamar dan selanjutnya di sentrifugasi dengan pengaturan kecepatan 12000 x g selama kurang lebih 5 menit pada suhu 4°C. Sentrifugasi tersebut bertujuan untuk memisahkan larutan menjadi 3 lapisan: yang pertama yaitu *lower red organic phase* yang terdapat mengandung protein, kedua *interphase* yang terdapat mengandung DNA, dan yang ketiga *upper aqueous phase* atau sebagai containing RNA. Pada lapisan teratas kemudian diambil dan dipindahkan ke tube baru. Hasil larutan RNA kemudian dianalisis kemurnian dan konsentrasinya dengan Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer menggunakan μ Drop plates. Konsentrasi RNA yang dibutuhkan adalah 0.0005 – 0.25 μ g / μ L dengan nilai kemurnian A260/280 pada rasio 1.8-2.0 sebagai syarat RNA terbebas dari kontaminan berupa DNA dan protein.

4.5.8.2. Sintesis cDNA

Sample mix dibuat dengan melarutkan 2 μ L RNA *template*, 1 μ L dNTP mix, 1 μ L primer oligo(dT) dan 6 μ L *nuclease free water* dalam *thermal cycler tube*. Sampel mix kemudian diresuspensi dan diinkubasi dalam *thermal cycler* pada suhu 70°C selama 10 menit. Tube selanjutnya diambil dan ditambahkan reagen mix yang terdiri dari 1 μ L

enhanced avian RT, 2 μ L 10x *buffer* for eAMV-RT, 1 μ L RNase *inhibitor* dan 6 μ L *nuclease free water*. Tube berisi sampel dan reagen mix kemudian dimasukan kembali kedalam *thermal cycler* dan selanjutnya diinkubasi dengan suhu 45°C selama kurang lebih 30 menit. Tube sampel kemudian diambil dan sampel dapat disimpan pada suhu - 20°C selama 1 bulan untuk proses analisis selanjutnya.

4.5.8.3. Analisis qRT-PCR

Ekspresi mRNA dari gen Nrf2 dianalisis menggunakan qRT-PCR. Master mix untuk qRT-PCR dibuat dengan melarutkan 3 μ L sampel cDNA, primer Nrf2 forward (5'-CAGCGACGGAAAGAGTATGA-3') dan reverse (5'-TGGGCAACCTGGGAGTAG-3') atau primer GAPDH forward (5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3') dan reverse (5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3') masing-masing 1 μ L, SYBR Fast master mix universal sebanyak 10 μ L dan *nuclease free water* 6 μ L. Master mix kemudian dibaca menggunakan illumina eco RT-PCR dengan program amplifikasi 40 siklus yaitu: 1) denaturasi awal dengan suhu 95°C selama 3 menit, 2) denaturasi kedua dengan suhu 95°C selama 1 menit dan 3) annealing 60°C selama 1 menit. Data peningkatan terhadap ekspresi gen dapat dianalisis kedalam

ratio peningkatan gen target dengan housekeeping gen yang dapat menggunakan software EcoStudy.

4.5.9. Uji Kadar GPx

Jaringan kulit sampel tikus dikumpulkan dan dipotong kecil menggunakan pinset. Jaringan kulit sebanyak 5 mg dimasukan dalam mikrotube dan 300 μ L *protein extraction buffer* dicampurkan dan kemudian dihomogenisasi menggunakan ultrasonikator. dan diisolasi proteinnya menggunakan RIPA Buffer Reagent dan dianalisis kadar GPx menggunakan ELISA sesuai protokol pabrikan (Elabscience, TX, USA). Larutan standar dibuat dengan melakukan metode pengenceran menggunakan protein *lyophilized* dan buffer sesuai seri konsentrasi yang ditetapkan protokol. Medium kultur dan larutan standar sesuai seri konsentrasi kemudian dimasukan ke dalam *well plate* 96. ELISA yang mengandung antibody dan diinkubasi selama kurang lebih 1 jam. Sampel selanjutnya dibuang dan antibody primer kemudian ditambahkan pada masing-masing sampel selanjutnya diinkubasi selama kurang lebih 1 jam dalam suhu 37°C. Sampel selanjutnya dicuci tiga kali menggunakan PBS. HRP *Conjugate* kemudian ditambahkan pada setiap sampel kemudian diinkubasi selama kurang lebih 30 menit dalam suhu 37°C dan ruangan yang gelap. Sampel kemudian dicuci lima kali menggunakan PBS. Reagen substrat kemudian ditambahkan dan

diinkubasi selama kurang lebih 15 menit dalam suhu 37°C pada ruangan yang gelap. *Stop solution* kemudian ditambahkan dan sampel dianalisis menggunakan ELISA reader pada panjang dan gelombang 450 nm.

4.6. Waktu dan tempat Penelitian

Pada penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September hingga Oktober 2024, di *Integrated Laboratory of SCCR* Indonesia, Semarang.

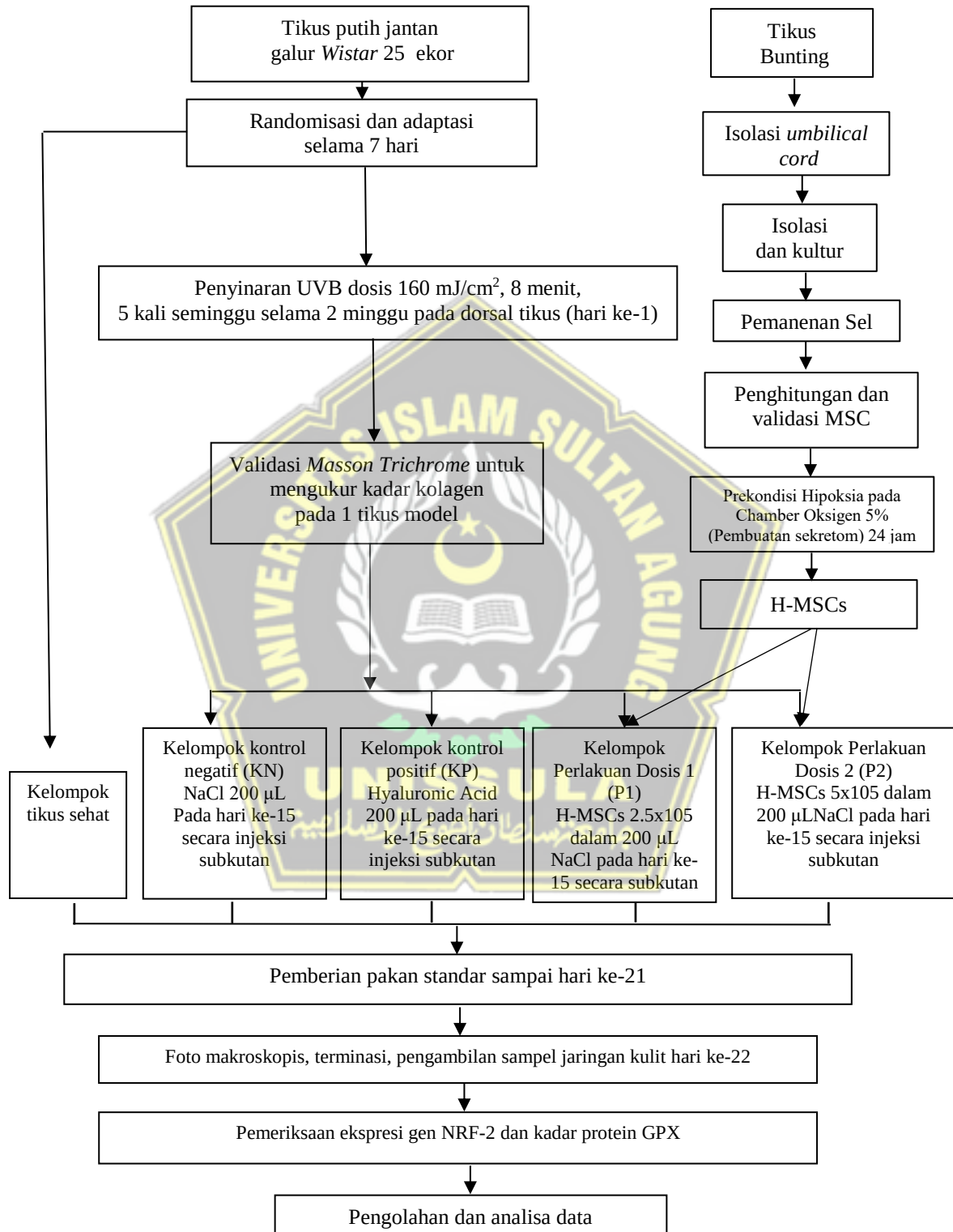
4.7. Analisis Data

Hasil kuantifikasi dianalisis secara statistik menggunakan software SPSS versi 26.0. Untuk menentukan signifikansi antar kelompok penelitian, dilakukan analisis dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varian menggunakan *Levene's Test*. Pada data kadar Gpx data menunjukkan distribusi normal ($p > 0,05$) dan varian yang homogen ($p > 0,05$), uji perbedaan dilakukan dengan metode *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) di antara kelompok, uji lanjut *Post Hoc Least Significant Difference* (LSD) diterapkan untuk menentukan signifikansi perbedaan antar kelompok. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pada data ekspresi Nrf2 diperoleh distribusi data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) di antara semua kelompok penelitian, uji *Mann-Whitney* digunakan untuk menentukan signifikansi

perbedaan antar kelompok. Nilai $p < 0,05$ mengindikasikan adanya perbedaan signifikan di antara kelompok-kelompok tersebut.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

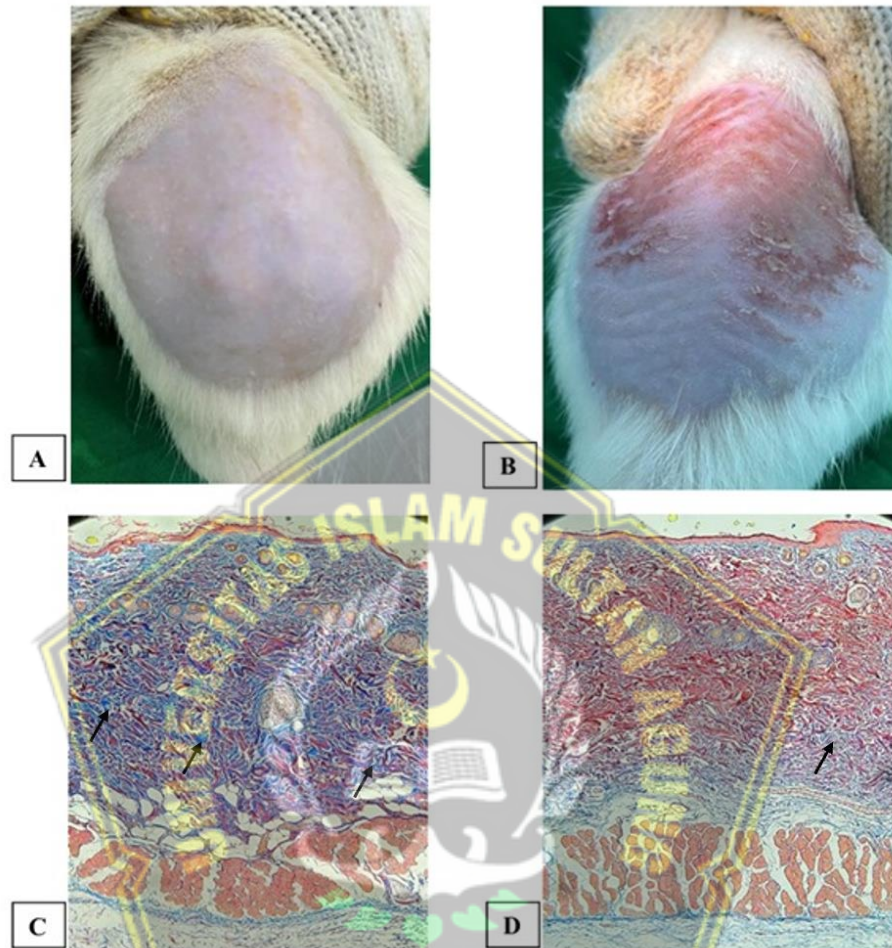
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini dilaksanakan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang, selama periode Oktober-November 2024. Subjek penelitian terdiri dari 25 ekor tikus jantan galur Wistar, berusia 2-3 bulan dengan berat 200-250 gram. Tikus disinari sinar UVB 302 nm dengan dosis 160 mJ/cm² selama 8 menit, 5 kali seminggu (hari ke-1, 2, 4, 5, dan 7) selama 2 minggu pada bagian punggung, dan tidak ada subjek yang dieksklusi selama penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa pengaruh pemberian H-MSCs terhadap ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi UVB. Hasil pada penelitian ini adalah pemberian H-MSCs secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi gen Nrf2 dan kadar GPx.

Pada penelitian ini sebelum dilakukan pengukuran hasil dilakukan validasi *collagen loss* dengan pewarnaan kolagen *Masson-trichrome*. Pengamatan anatomis pada hari ke-15 menunjukkan perubahan signifikan pada kulit dorsal tikus yang terpapar sinar UVB dibandingkan dengan kelompok sehat. Tikus yang terkena paparan UVB memperlihatkan tanda-tanda eritema (kemerahan) dan kerutan yang jelas (Gambar 5.1 A-B). Dampak paparan sinar UVB terhadap jumlah kolagen dikulit dinilai dengan pemeriksaan mikroskopis menggunakan pewarnaan *masson trichrome* pada hari yang sama. Hasil analisis mikroskopis mengungkapkan adanya pengurangan kolagen (*collagen loss*) yang nyata pada tikus yang terpapar UVB dan sangat kontras berbeda dengan kondisi tikus yang tidak terpapar (Gambar 5.1 C-D). Temuan ini menggambarkan efek merugikan

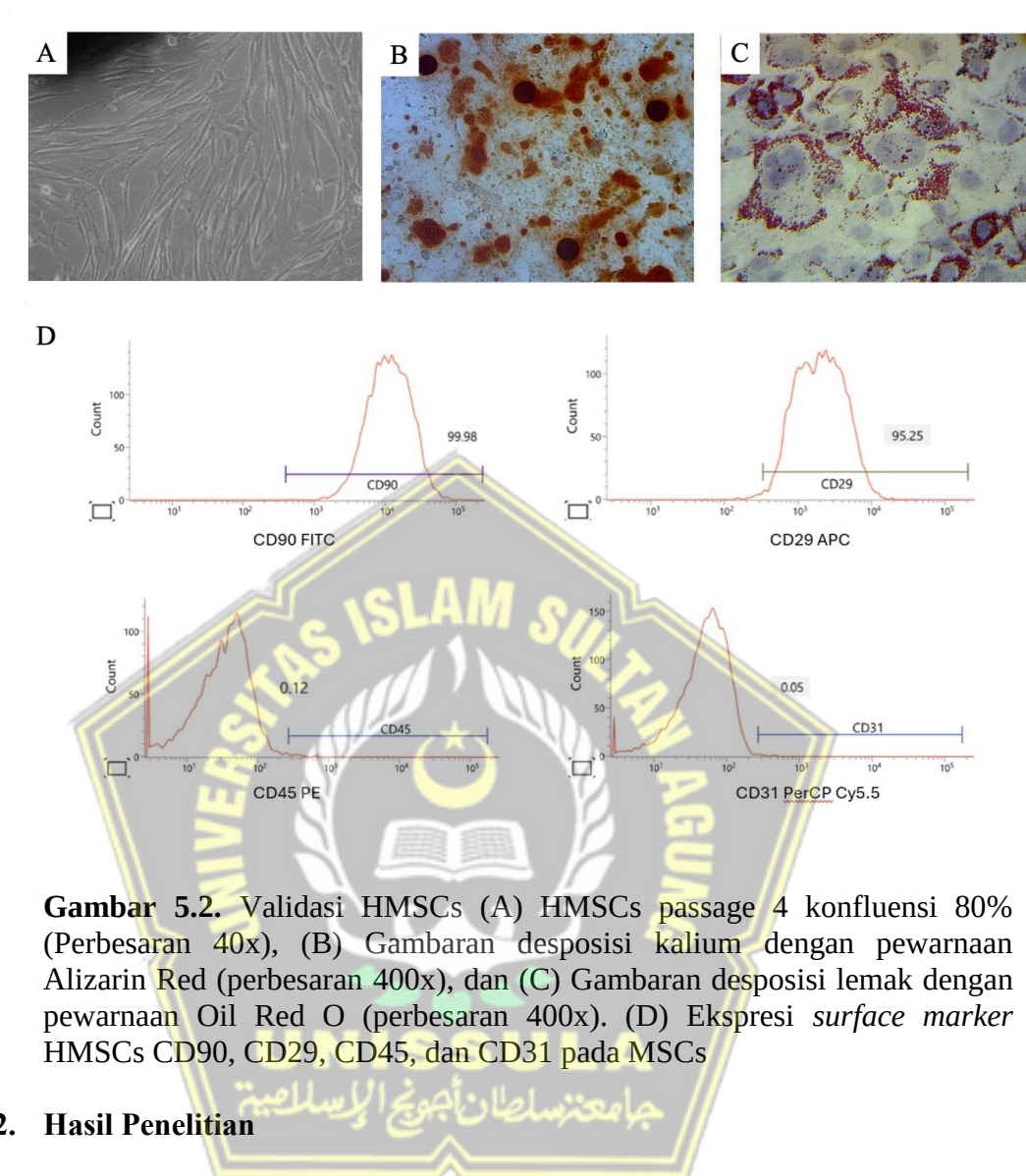
dari paparan UVB terhadap integritas dan kualitas kulit tikus



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).

3.1. Hasil Validasi *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (H-MSCs)

Proses isolasi MSCs dilaksanakan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Indonesia (SCCR) di Semarang, dengan menggunakan tali pusat tikus yang sedang bunting 19 hari. Sel-sel hasil isolasi kemudian dikultur dalam flask khusus dengan media yang sesuai. Setelah melalui empat kali pasase dan dipapar kondisi hipoksia selama 24 jam, sel-sel MSCs menunjukkan karakteristik melekat pada dasar flask dengan bentuk khas *spindle* (Gambar 5.2 A). Uji validasi identitas pada sel *hypoxia mesenchymal stem cells* (H-MSCs) dilakukan dengan mengkultur sel H-MSCs dalam media yang mendorong diferensiasi osteogenik dan adipogenik selama 14 hari. Diferensiasi osteogenik dibuktikan dengan adanya deposit kalsium yang terlihat melalui pewarnaan *Alizarin Red* (Gambar 5.2 B), sementara diferensiasi adipogenik ditandai oleh akumulasi *droplet* lipid yang terdeteksi melalui pewarnaan *Oil Red O* (Gambar 5.2 C). Kedua jenis diferensiasi ini ditunjukkan oleh warna merah pada kultur di masing-masing medium. Validasi lebih lanjut dilakukan menggunakan *flow cytometry* untuk menganalisis ekspresi *surface marker*. Hasil analisis kuantitatif menunjukkan ekspresi positif yang tinggi untuk CD90 (99,98%) dan CD29 (95,25%), serta ekspresi negatif untuk CD45 (0,12%) dan CD31 (0,05%) (Gambar 5.2 D). Profil ekspresi ini mengonfirmasi identitas dan kemurnian populasi H-MSCs yang diisolasi.



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

3.2. Hasil Penelitian

3.2.1. Efek Pemberian H-MSCs terhadap Ekspresi Gen *Nrf2*

Penelitian *Hypoxia Mesencymal Stem Cell* (HMSCs) terhadap ekspresi gen *Nrf2* dan kadar *GPx* pada tikus galur wistar yang di induksi 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 pada Ekspresi gen *Nrf2*

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Ekspresi gen						
<i>Nrf2</i>	1,05	0,80	1,23	1,41	1,61	
Mean	0,03	0,21	0,16	0,21	0,19	
Std.deviasi						
<i>Shapiro Wilk</i>	0,006	0,594*	0,011	0,089*	0,095*	
<i>Levene test</i>						0,064**
Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$						

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata rasio ekspresi gen *Nrf2* terendah yaitu pada kelompok tikus kelompok negatif yang disinari UVB dan hanya diberikan *vehicle* berupa NaCl 0,9% 200uL sebesar $0,80 \pm 0,21$, kemudian diikuti oleh kelompok sehat yaitu sebesar $1,05 \pm 0,03$. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif mengalami penurunan ekspresi gen *Nrf2* dibandingkan pada kondisi sehat. Pada kelompok perlakuan baik kontrol positif dan kelompok perlakuan H-MSCs secara subkutan pada dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel mengalami peningkatan ekspresi gen *Nrf2*. Pada kelompok kontrol positif mengalami peningkatan rasio ekspresi gen *Nrf2* sebesar $1,23 \pm 0,16$. Pada kelompok perlakuan H-MSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel meningkatkan ekspresi gen *Nrf2* sebesar $1,41 \pm 0,21$. Dosis H-MSCs 5×10^5 sel dapat meningkatkan ekspresi gen *Nrf2* tertinggi dibandingkan kelompok yang lainnya sebesar $1,61 \pm 0,19$. Seluruh data rasio ekspresi *Nrf2* pada kelompok sehat dan kelompok kontrol positif berdasarkan uji *shapiro wilk* data tidak berdistribusi

normal dengan nilai $p\text{-value} < 0,05$ dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data yang homogen dengan nilai $p\text{-value}$ ($p > 0,05$).

Tabel 5.2. Hasil Analisis Uji Non Parametrik *Kruskall Wallis* Ekspresi gen *Nrf2*

Uji Beda	Total sampel	Sig
<i>Kruskall wallis</i>	25	0,047*
* $p < 0,05$ = berbeda signifikan		

Sebaran data yang tidak normal dan homogen maka analisis data menggunakan uji non parametrik *Kruskall Wallis*. Hasil uji *Kruskall Wallis* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian dengan nilai $p\text{-value}$ 0,047 ($p < 0,05$). Hasil signifikan pada uji *Kruskall Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

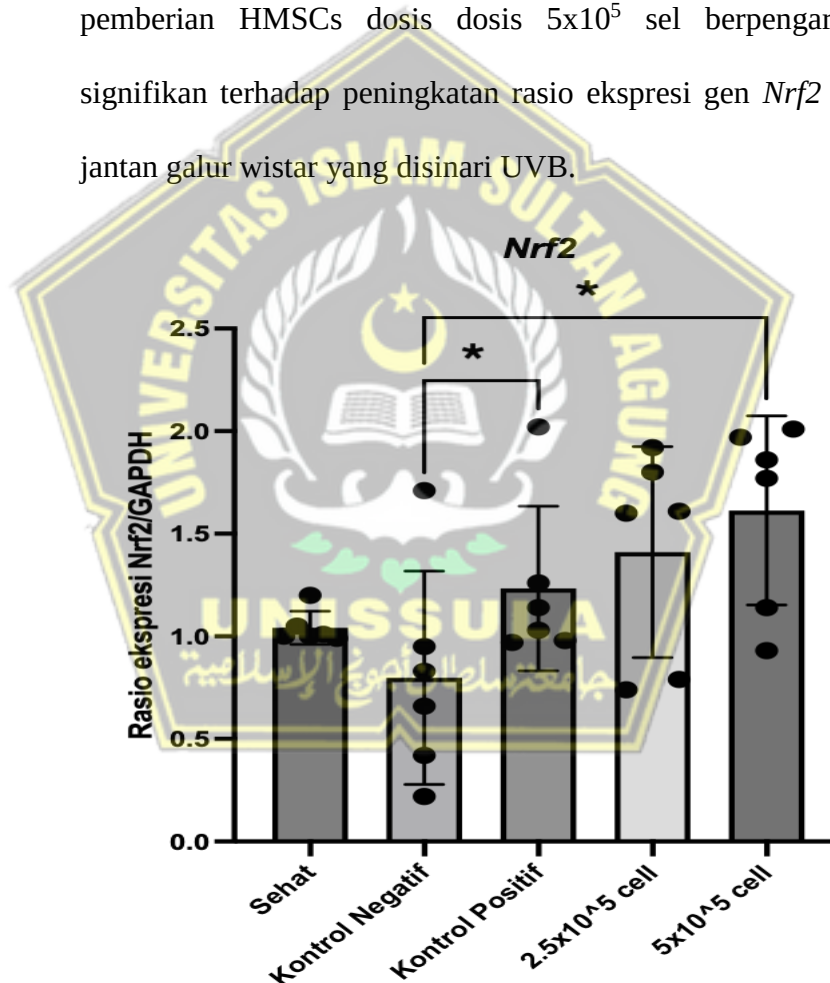
Tabel 5.3. Perbedaan Ekspresi gen *Nrf2* antara kelompok penelitian

	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0,054	0,699	0,394	0,093
K2	0,054		0,041*	0,132	0,015*
K3	0,699	0,041*		0,818	0,394
K4	0,394	0,132	0,818		0,310
K5	0,093	0,015*	0,394	0,310	

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

Hasil uji *Mann Whitney* rasio ekspresi gen *Nrf2* pada tabel 5.2 menunjukkan rasio ekspresi gen *Nrf2* pada kelompok tikus sehat tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap semua kelompok penelitian. Perbedaan secara signifikan hanya terdapat pada

kelompok kontrol negatif terhadap kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif terhadap kelompok H-MSCs dosis 5×10^5 sel dengan nilai $p < 0,05$. Kelompok kontrol negatif terhadap kelompok sehat dan kelompok H-MSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian HMSCs dosis dosis 5×10^5 sel berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan rasio ekspresi gen *Nrf2* pada tikus jantan galur wistar yang disinari UVB.



Gambar 5.3. Rasio ekspresi gen *Nrf2* 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.

3.2.2. Efek Pemberian H-MSCs terhadap Kadar GPx

Rerata kadar GPx terendah yaitu pada kelompok kontrol negatif yang disinari UVB dan hanya diberikan *vehicle* berupa NaCl 0,9% 200uL sebesar $36,88 \pm 3,22$ pg/mL, kemudian diikuti oleh kelompok kontrol positif yaitu kelompok yang mendapatkan perlakuan HA dosis 200uL secara subkutan memiliki kadar GPx sebesar $55,03 \pm 3,53$ pg/mL. Kadar GPx pada kelompok kontrol positif masih lebih rendah dibandingkan kelompok sehat yang sebesar $63,54 \pm 2,07$ pg/mL. Pada pemberian H-MSCs baik dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan dosis 5×10^5 sel dapat meningkatkan kadar GPx sebesar masing-masing $64,18 \pm 4,56$ pg/mL dan $94,88 \pm 5,34$ pg/mL.

Tabel 5.4. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Ekspresi gen GPx

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Kadar GPx						
Mean	63,54	36,88	55,03	64,18	94,88	
Std.deviasi	2,07	3,22	3,53	4,56	5,34	
Shapiro Wilk	0,791*	0,486*	0,821*	0,108*	0,654*	
Levene test						0,278**
Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$						

Seluruh kelompok kadar GPx berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai *p-value* $> 0,05$ dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data homogen dengan nilai *p-value* 0,278 ($p > 0,05$).

Tabel 5.5. Hasil Analisis Uji Parametrik *One Way ANOVA* Ekspresi gen *GPx*

Uji Beda	Total sampel	Sig
<i>One Way ANOVA</i>	25	0,001*

* $p < 0,05$ = berbeda signifikan

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* 0,001 ($p < 0.05$). Hasil signifikan pada uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji (*Least Significant Difference*) *post hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

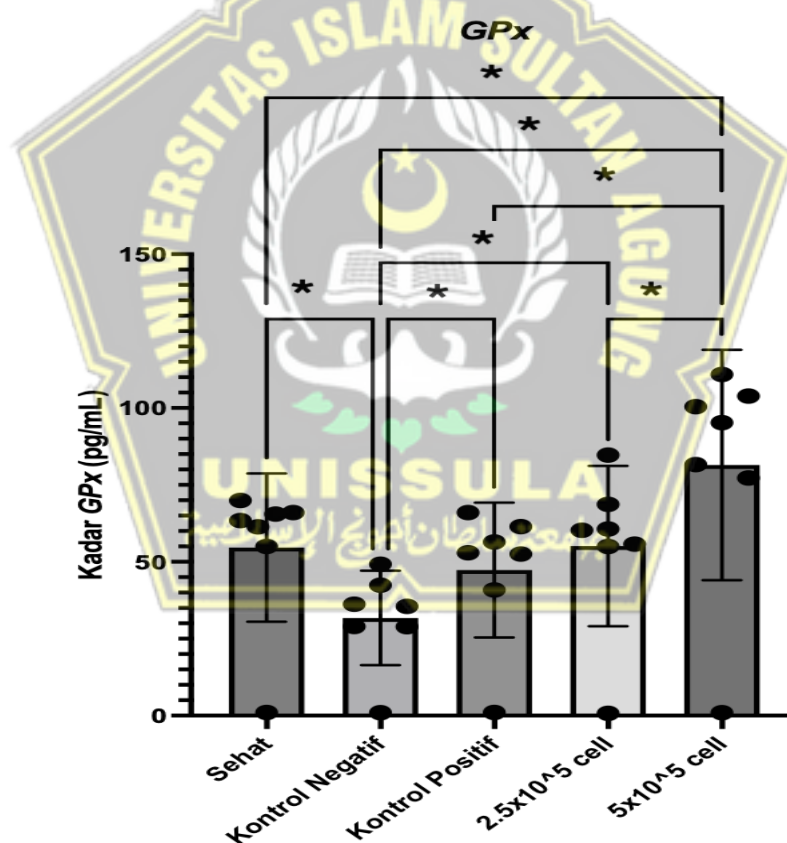
Tabel 5.6. Perbedaan Kadar *GPx* antara kelompok penelitian

	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0,001*	0,137	0,909	0,001*
K2	0,001*		0,003*	0,001*	0,001*
K3	0,137	0,003*		0,111	0,001*
K4	0,909	0,001*	0,111		0,001*
K5	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	

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

Hasil uji *post hoc LSD* pada tabel 5.3 menunjukkan kadar *GPx* pada kelompok tikus sehat (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok penelitian kontrol negatif (K2) dan kelompok H-MSCs dosis 5×10^5 sel dengan nilai $p < 0,05$. Uji *post hoc LSD* kelompok kontrol negatif berbeda signifikan dengan semua kelompok penelitian ditandai dengan nilai $p < 0,05$. Kelompok kontrol

positif (K3) berbeda signifikan dengan kelompok H-MSCs dosis 5×10^5 sel (K5). Pada kelompok perlakuan H-MSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel (K4) berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan HMSCs dosis 5×10^5 sel (K5) dengan nilai $p < 0,05$ (0,001). 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 peningkatan kadar GPx pada tikus jantan galur wistar yang disinari UVB, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.4. Kadar GPx 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.

3.3. Pembahasan

Radiasi sinar UVB merupakan penyebab utama berkurangnya kolagen kulit yang ditandai dengan kondisi stress oksidatif yang berlebihan⁵⁷. Peningkatan kadar ROS menginduksi ekspresi *sirtuins 1 (Sirt1)* yang akan mengaktifkan protein (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) *PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α)*⁵⁸. Aktivasi PGC-1 α menginduksi ubiquitinasi *kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)*, jika *Keap1* terikat dengan *Nrf2* maka akan mengaktifkan ekspresi enzim antioksidan *GPx*^{25,58}. Pada paparan sinar UVB peningkatan kadar ROS yang berlebihan menyebabkan sistem antioksidan tidak dapat kembali mengembalikan ke kondisi homeostatis yang menyebabkan kadar enzim antioksidan *GPx* sangat rendah⁵⁵. Kondisi tersebut akan memicu aktivasi faktor transkripsi *NF- κ B* untuk menginduksi transkripsi sitokin proinflammasi sehingga menginduksi berbagai jalur, salah satunya produksi enzim *MMP-1* dan *MMP-3*⁵⁹. Enzim *MMPs* ini mendegradasi ekstra seluler matriks dan menyebabkan degradasi kolagen⁶⁰. *Nrf2* adalah faktor transkripsi utama untuk regulator antioksidan seluler seperti *GPx*, yang mengikat elemen respons antioksidan dan memainkan peran penting dalam degradasi kolagen⁶¹.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian H-MSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel secara subkutan dapat meningkatkan ekspresi gen *Nrf2* dan kadar *GPx* secara signifikan. Penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa pemberian MSCs dapat

meningkatkan ekspresi Nrf2⁶¹. Penelitian lain juga membuktikan bahwa pemberian MSCs dan secretom MSCs meningkatkan ekspresi Nrf2 pada sel fibroblast *in vitro* yang menyebabkan induksi enzim antioksidan SOD⁶². H-MSCs memiliki aktivitas parakrin dengan mensekresikan berbagai faktor pertumbuhan seperti *growth factors transforming growth factor-B* (TGF-B), *platelet-derived growth factors* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF), dan *hepatocyte growth factor* (HGF), sitokin anti-inflamasi seperti interleukin-10 (IL-10), dan vesikel ekstraseluler yang dapat merangsang sel fibroblast dan keratinosit^{63,64}. Faktor parakrin ini dapat menginduksi ekspresi GPx dan Nrf2 pada fibroblast dan keratinosit dermal, sehingga meningkatkan kapasitas antioksidan sel tersebut untuk mencegah terjadinya degradasi kolagen⁶¹. Aktivitas antiinflamasi H-MSCs dengan menginduksi IL-10 tidak hanya mengaktifkan jalur *signal transducer and activator of transcription 3* STAT3, tetapi juga dapat memicu aktivasi Nrf2^{53,65}. Aktivasi Nrf2 oleh IL-10 dapat terjadi melalui modulasi stres oksidatif dan jalur pensinyalan seluler *kinase I κ B* (IKK) sehingga memproduksi GPx untuk mencegah stress oksidatif⁶¹. Pada penelitian ini pengamatan pada hari ke-22 menunjukkan bahwa ekspresi gen Nrf2 pada kelompok kontrol negatif masih lebih rendah dari pada kelompok normal namun tidak berbeda secara signifikan, hal ini dimungkinkan karena pada saat hari ke-22 kondisi tanpa pengobatan sudah mulai melakukan transkripsi gen untuk menjaga kondisi homeostatis⁶¹.

Kemampuan parakrin H-MSCs untuk memicu ekspresi IL-10 pada sel fibroblast dan keratinosit memicu sinergitas dengan ekspresi Nrf2, sehingga dapat menekan inflamasi dengan menghambat aktivasi jalur NF- κ B oleh SOCS3^{65,66}. Nrf2 juga diketahui dapat menekan aktivitas NF- κ B, sehingga memperkuat efek antiinflamasi dari IL-10^{61,67}. IL-10 telah terbukti mempengaruhi metabolisme seluler, termasuk fungsi mitokondria pada sel fibroblast⁶⁸. Aktivasi Nrf2 dan peningkatan GPx juga berkontribusi pada perlindungan mitokondria dan regulasi metabolisme sel, yang penting dalam respons terhadap stres dan degradasi kolagen⁶⁹. Aktivasi jalur Nrf2, H-MSCs dapat meningkatkan ekspresi dan aktivitas enzim antioksidan GPx, yang secara efektif dapat menetralkan dan mengais ROS, sehingga mengurangi stres oksidatif^{38,69}. ROS yang netral menyebabkan penurunan MMPs sehingga kolagen tidak terdegradasi⁶⁰. Gen GPx yang diaktifkan akibat ROS memicu jalur Wnt dimana *nuclear redox protein* (NRX) melepaskan *disheveled* (DVL), yang menghambat *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) dan menstabilkan β -catenin. β -catenin kemudian memasuki nukleus dan mengaktifkan transkripsi gen GPx sehingga stress oksidatif ditekan^{70,71}. GPx adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisis 2GSH teroksidasi menjadi molekul GSH stabil (GSSG) dan dua molekul air (2H₂O)⁷². GSH teroksidasi diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme oksigen dan lipid, jika tidak diatur, menyebabkan banyak jenis kerusakan sel⁷³. Dengan demikian, GPx merupakan pertahanan antioksidan penting di semua sel hidup yang terpapar oksigen radikal⁷³.

Pada penelitian ini juga terbukti kadar GPx meningkat pada kelompok yang diberikan injeksi subkutan H-MSCs. 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* (GPx) sehingga dapat menurunkan kadar stress oksidatif dan level inflammasi ⁶. Penelitian lain juga telah membuktikan bahwa MSCs menginduksi ekspresi enzim antioksidan seperti GPx dan SOD pada sel fibroblast yang mengalami kerusakan akibat sinar UVB ⁷⁴. H-MSCs mempengaruhi Ser212 melalui gugus 3'-OH menyebabkan penghambatan aktivitas protein kinase kinase *mitogen-activated protein kinase kinase 1* (MEK1) ^{75,76}. H-MSCs juga menghambat aktivasi phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan mengaktivasi protein kinase *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) untuk menginduksi ekspresi enzim antioksidan ^{77,78}. Stres oksidatif yang netral menyebabkan penurunan enzim MMPs sehingga kolagen tidak terdegradasi ⁷⁷. Studi menunjukkan bahwa HMSCs dapat meningkatkan produksi kolagen tipe I dan tipe III melalui domain pengikatan matriks sehingga mencegah kerusakan oksidatif ^{79,80}. Tingkat ekspresi MMPs yang diinduksi UVB ditemukan berkurang pada tikus transgenik IL-10-overexpressing dibandingkan dengan tikus *wild type* ⁸¹. Pada penelitian ini ekspresi gen GPx juga terbukti meningkat dengan pemberian HA, penelitian sebelumnya melaporkan bahwa HA dapat menginduksi ekspresi GPx-1 melalui *MAPK*

*pathway*⁸². Secara keseluruhan *Nrf2* dan *GPx* dapat memainkan peran penting dalam mengatur kolagen kulit⁷⁷. Temuan ini menunjukkan bahwa menginduksi ekspresi gen *Nrf2* dan kadar *GPx* bisa menjadi strategi terapi yang menjanjikan untuk mencegah degradasi kolagen akibat paparan UVB.

Pada penelitian ini pemberian kontrol positif HA juga terbukti dapat meningkatkan ekspresi gen *Nrf2* dan *GPx* secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal ini dapat menjadi dasar penelitian selanjutnya, dimana untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh HA dapat dikombinasikan dengan H-MSCs, sehingga dengan dosis HA yang kecil dapat menekan efek samping namun memiliki efektifitas terapi yang efisien. Pemberian kombinasi ini mungkin dapat menyebabkan hambatan collagen loss melalui berbagai mekanisme yang lebih efektif. Keterbatasan pada penelitian ini tidak menganalisis ekspresi berbagai sitokin dan *growth factor* yang dipicu H-MSCs untuk mencegah degradasi kolagen yang mempengaruhi ekspresi *Nrf2* dan *GPx*. Pada penelitian ini jalur faktor transkripsi NF-KB merupakan salah satu jalur yang merangsang aktivasi *Nrf2* melalui efek sitokin anti-inflamasi dan jalur Wnt yang mengatur ekspresi *GPx* akibat stress oksidatif belum dianalisa. Pada penelitian ini aktivitas antioksidan yang diamati hanya mengamati kadar *GPx*, sedangkan masih terdapat beberapa enzim antioksidan yang dipengaruhi akibat paparan UVB seperti SOD dan catalase yang belum dianalisa.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian H-MSCs terhadap peningkatan ekspresi gen *Nrf2* namun tidak berbeda secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi H-MSCs secara injeksi subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dibandingkan kontrol secara *in vivo*.
2. Terdapat pengaruh pemberian H-MSCs terhadap peningkatan ekspresi gen *Nrf2* secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi H-MSCs secara injeksi subkutan dengan dosis 5×10^5 sel dibandingkan kontrol secara *in vivo*.
3. Terdapat pengaruh pemberian H-MSCs terhadap peningkatan kadar *GPx* secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi H-MSCs secara injeksi subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dibandingkan kontrol secara *in vivo*.
4. Terdapat pengaruh pemberian H-MSCs terhadap peningkatan kadar *GPx* secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan sinar UV-B setelah diberi H-MSCs secara injeksi subkutan dengan dosis 5×10^5 sel dibandingkan kontrol secara *in vivo*.

6.2. Saran

1. Penelitian ini bisa dilanjutkan dengan meneliti sitokin dan growth factor yang dipicu oleh MSCs untuk merangsang sintesis kolagen.
2. Penelitian ini bisa dilanjutkan dengan meneliti ekspresi faktor transkripsi NF-KB yang berperan dalam menginduksi ekspresi Nrf2 dan jalur Wnt yang mempengaruhi ekspresi GPx.
3. Pada penelitian selanjutnya juga berpotensi meneliti ekspresi enzim antikoksidan lain yang berperan dan memperbaiki kondisi kolagen loss akibat sinar UVB seperti SOD dan katalase.
4. Penelitian ini bisa dilanjutkan dengan meneliti efek kombinasi HA dan HMSCs dalam mencegah collagen loss.
5. Penelitian ini berpotensi dilanjutkan untuk mengetahui efek pemberian HMSCs dengan dosis yang terkonversi dari penelitian pada manusia sebagai studi klinik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Huang AH, Chien AL. Photoaging: a Review of Current Literature. Vol. 9, Current Dermatology Reports. Springer; 2020. p. 22–9.
2. Han SH, Ballinger E, Choung SY, Kwon JY. Anti-Photoaging Effect of Hydrolysates from Pacific Whiting Skin via MAPK/AP-1, NF- κ B, TGF- β /Smad, and Nrf-2/HO-1 Signaling Pathway in UVB-Induced Human Dermal Fibroblasts. Mar Drugs. 2022 May 1;20(5).
3. Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. Vol. 26, Redox Biology. Elsevier B.V.; 2019.
4. Süntar I, Çetinkaya S, Panieri E, Saha S, Buttari B, Profumo E, et al. Regulatory role of nrf2 signaling pathway in wound healing process. Vol. 26, Molecules. MDPI AG; 2021.
5. Musiał-Wysocka A, Kot M, Majka M. The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. Vol. 28, Cell Transplantation. SAGE Publications Ltd; 2019. p. 801–12.
6. Stavely R, Nurgali K. The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy. Vol. 9, Stem Cells Translational Medicine. John Wiley and Sons Ltd.; 2020. p. 985–1006.
7. Widowati W, Rihibiha DD, Khiong K, Widodo MA, Sumitro SB, Bachtiar I. Hypoxia in Mesenchymal Stem Cell. In: Hypoxia and Human Diseases. InTech; 2017.
8. Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. Vol. 18, Stem Cell Reviews and Reports. Springer; 2022. p. 1525–45.
9. Silina E, Stupin V, Koreyba K, Bolevich S, Suzdaltseva Y, Manturova N. Local and remote effects of mesenchymal stem cell administration on skin wound regeneration. Pathophysiology. 2021 Sep 1;28(3):355–72.
10. Manríquez JJ, Cataldo K, Vera-Kellet C, Harz-Fresno I. Wrinkles [Internet]. 2014. Available from: www.clinicalevidence.com
11. 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 Feb;222(1):74–80.
12. Durai PC, Thappa DM, Kumari R, Malathi M. Aging in elderly: Chronological versus photoaging. Indian J Dermatol. 2012 Sep;57(5):343–52.
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 Dec 1;43(6):2232–44.
14. 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 Feb 13;21(1).

15. 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. Vol. 2, *Clinical Interventions in Aging*. 2007.
16. 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. Vol. 12, *International Journal of Stem Cells*. Sungkyunkwan University; 2019. p. 218–26.
17. Lan YW, Choo KB, Chen CM, Hung TH, Chen Y Bin, Hsieh CH, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther*. 2015 May 20;6(1).
18. Xiong Y, Xiong Y, Zhang H, Zhao Y, Han K, Zhang J, et al. hPMSCs-Derived Exosomal miRNA-21 Protects Against Aging-Related Oxidative Damage of CD4⁺ T Cells by Targeting the PTEN/PI3K-Nrf2 Axis. *Front Immunol*. 2021 Nov 23;12.
19. Valle-Prieto A, Conget PA. Human Mesenchymal Stem Cells Efficiently Manage Oxidative Stress [Internet]. Available from: www.promega.com=biomath=calc11.htm#disc
20. Fu H, Sen L, Zhang F, Liu S, Wang M, Mi H, et al. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles protect against oxidative stress-induced xenogeneic biological root injury via adaptive regulation of the PI3K/Akt/NRF2 pathway. *J Nanobiotechnology*. 2023 Dec 1;21(1).
21. Pricilla E, Veraida A, Julianto I, Kariosentono H, Budiani DR, Fibrianto YH, et al. The effect of injection of ADSC compared to APPE on collagen density in aging skin (animal study). *Journal of General-Procedural Dermatology & Venereology Indonesia*. 2017 Dec 31;2(2):58–63.
22. Kou Z, Li B, Aierken A, Tan N, Li C, Han M, et al. Mesenchymal Stem Cells Pretreated with Collagen Promote Skin Wound-Healing. *Int J Mol Sci*. 2023 May 1;24(10).
23. Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2 - An update. Vol. 66, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2014. p. 36–44.
24. Matzinger M, Fischhuber K, Heiss EH. Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? Vol. 36, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2018. p. 1738–67.
25. Menegon S, Columbano A, Giordano S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. Vol. 22, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2016. p. 578–93.
26. Moon EJ, Giaccia A. Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: Possible implications in cancer treatment. Vol. 79, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2015. p. 292–9.
27. Bae T, Hallis SP, Kwak MK. Hypoxia, oxidative stress, and the interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer. Vol. 56, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2024. p. 501–14.
28. David JA, Rifkin WJ, Rabbani PS, Ceradini DJ. The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus. Vol. 2017, *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Limited; 2017.

29. Cloer EW, Goldfarb D, Schrank TP, Weissman BE, Major MB. Nrf2 activation in cancer: From DNA to protein. Vol. 79, Cancer Research. American Association for Cancer Research Inc.; 2019. p. 889–98.
30. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans.* 2015 Aug 1;43:621–6.
31. Mugesh G, Panda A, Singh HB, Puneekar NS, Butcher RJ. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: A mechanistic study. *J Am Chem Soc.* 2001 Feb 7;123(5):839–50.
32. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation. Vol. 14, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media SA; 2023.
33. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Vol. 15, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011. p. 1957–97.
34. Saeedi P, Halabian R, Fooladi AAI. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. Vol. 6, *Stem Cell Investigation*. AME Publishing Company; 2019.
35. Isakson M, De Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJP. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. Vol. 2015, *Stem Cells International*. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
36. Brave H, MacLoughlin R. State of the art review of cell therapy in the treatment of lung disease, and the potential for aerosol delivery. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–37.
37. Abusalah MAH, Priyanka, Abd Rahman ENSE, Choudhary OP. Evolving trends in stem cell therapy: an emerging and promising approach against various diseases. *International Journal of Surgery*. 2024 Nov 8;
38. Su Y, Xu C, Cheng W, Zhao Y, Sui L, Zhao Y. Pretreated Mesenchymal Stem Cells and Their Secretome: Enhanced Immunotherapeutic Strategies. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2023.
39. Putra A. BASIC MOLECULAR STEM CELL. Soebandrio AKY, editor. Semarang: Unissula Press; 2019. 1–358 p.
40. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. Vol. 12, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2014.
41. Papanagiotou VD. Skin Aging and Photoaging. *Dermatology nursing*. 2009 Oct;57–65.
42. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. Vol. 31, *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 65–74.
43. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.

44. Knaggs H. Skin Aging in the Asian Population. In: *Skin Aging Handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*. Elsevier; 2008. p. 177–201.
45. Coppola D, Oliviero M, Vitale GA, Lauritano C, D'Ambra I, Iannace S, et al. Marine collagen from alternative and sustainable sources: Extraction, processing and applications. Vol. 18, *Marine Drugs*. MDPI AG; 2020.
46. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Jan;3(1):1–19.
47. Roig-Rosello E, Rousselle P. The human epidermal basement membrane: A shaped and cell instructive platform that aging slowly alters. Vol. 10, *Biomolecules*. MDPI AG; 2020. p. 1–32.
48. Amirrah IN, Lokanathan Y, Zulkiflee I, Wee MFMR, Motta A, Fauzi MB. A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold. Vol. 10, *Biomedicines*. MDPI; 2022.
49. Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P. Collagen VI at a glance. *J Cell Sci*. 2015;128(19):3525–31.
50. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in wound healing. Vol. 8, *Bioengineering*. MDPI AG; 2021.
51. Bartaula-Brevik S. Secretome of Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Accelerates Wound Healing and Vessel Formation In Vitro. *Int J Stem Cell Res Ther*. 2017 Jun 30;4(1).
52. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. Vol. 585, *European Journal of Pharmacology*. 2008. p. 325–37.
53. Su H, Wang Z, Zhou L, Liu D, Zhang N. Regulation of the Nrf2/HO-1 axis by mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles: implications for disease treatment. *Front Cell Dev Biol*. 2024 Jun 10;12.
54. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2020.
55. Li X, Zhang L, Xu YW, Wang C, Zhao Y, Yu P, et al. The protective effects of 6-CySeCD with GPx activity against UVB-induced injury in HaCaT cells. *Australasian Journal of Dermatology*. 2013 May;54(2):120–5.
56. Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, et al. p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Dec 29;281(52):39776–84.
57. Tu Y, Quan T. Oxidative stress and human skin connective tissue aging. Vol. 3, *Cosmetics*. MDPI AG; 2016.
58. Abu Shelbayeh O, Arroum T, Morris S, Busch KB. PGC-1 α Is a Master Regulator of Mitochondrial Lifecycle and ROS Stress Response. Vol. 12, *Antioxidants*. MDPI; 2023.
59. 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.

60. Buechner N, Schroeder P, Jakob S, Kunze K, Maresch T, Calles C, et al. Changes of MMP-1 and collagen type I α 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp Gerontol*. 2008 Jul;43(7):633–7.
61. Vahidinia Z, Azami Tameh A, Barati S, Izadpanah M, Seyed Hosseini E. Nrf2 activation: a key mechanism in stem cell exosomes-mediated therapies. Vol. 29, *Cellular and Molecular Biology Letters*. BioMed Central Ltd; 2024.
62. Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirizadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, et al. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress Chaperones*. 2012 Sep;17(5):553–65.
63. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
64. Grafe I, Alexander S, Peterson JR, Snider TN, Levi B, Lee B, et al. TGF- β family signaling in mesenchymal differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 May 1;10(5).
65. 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 Dec 15;7(23):3937–43.
66. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. Vol. 316, *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc.; 2010. p. 2213–9.
67. Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirizadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, et al. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress Chaperones*. 2012 Sep;17(5):553–65.
68. Singampalli KL, Balaji S, Wang X, Parikh UM, Kaul A, Gilley J, et al. The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
69. Wang T, Jian Z, Baskys A, Yang J, Li J, Guo H, et al. MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system. *Biomaterials*. 2020 Oct 1;257.
70. Li F, Dai L, Niu J. GPX2 silencing relieves epithelial–mesenchymal transition, invasion, and metastasis in pancreatic cancer by downregulating Wnt pathway. *J Cell Physiol*. 2020 Nov 1;235(11):7780–90.
71. Trejo-Solis C, Escamilla-Ramirez A, Jimenez-Farfan D, Castillo-Rodriguez RA, Flores-Najera A, Cruz-Salgado A. Crosstalk of the wnt/ β -catenin signaling pathway in the induction of apoptosis on cancer cells. Vol. 14, *Pharmaceuticals*. MDPI; 2021.
72. Tsubouchi K, Araya J, Yoshida M, Sakamoto T, Koumura T, Minagawa S, et al. Involvement of GPx4-Regulated Lipid Peroxidation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *The Journal of Immunology*. 2019 Oct 15;203(8):2076–87.
73. Buday K, Conrad M. Emerging roles for non-selenium containing ER-resident glutathione peroxidases in cell signaling and disease. Vol. 402, *Biological Chemistry*. De Gruyter Open Ltd; 2021. p. 271–87.

74. Deng M, Yu Z, Li D, Wang X, Zhou G, Liu W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived and dermal fibroblast-derived extracellular vesicles protect dermal fibroblasts from ultraviolet radiation-induced photoaging: In vitro. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2020 Mar 1;19(3):406–14.
75. 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 Jun 1;74(3):177–82.
76. Xiong H, Guo Z, Tang Z, Ai X, Qi Q, Liu X, et al. Mesenchymal Stem Cells Activate the MEK/ERK Signaling Pathway and Enhance DNA Methylation via DNMT1 in PBMC from Systemic Lupus Erythematosus. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
77. Chaiprasongsuk A, Panich U. Role of Phytochemicals in Skin Photoprotection via Regulation of Nrf2. Vol. 13, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
78. Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration.
79. 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 Jun 2;22(12).
80. Quade M, Münch P, Lode A, Duin S, Vater C, Gabrielyan A, et al. The Secretome of Hypoxia Conditioned hMSC Loaded in a Central Depot Induces Chemotaxis and Angiogenesis in a Biomimetic Mineralized Collagen Bone Replacement Material. *Adv Healthc Mater*. 2020 Jan 1;9(2).
81. Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res*. 2009 Jan 30;104(2).
82. Sim WJ, Kim J, Baek KS, Lim W, Lim TG. Porcine Placenta Peptide Inhibits UVB-Induced Skin Wrinkle Formation and Dehydration: Insights into MAPK Signaling Pathways from In Vitro and In Vivo Studies. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 1;25(1).