

**PENGARUH *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL*
TERHADAP EKSPRESI p65 DAN KADAR IL-1 β**

(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Galur Wistar Model *Collagen Loss*
yang Dipapar Sinar UVB)

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Yeni Nila Fristiani

MBK. 2322010422

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

TESIS
PENGARUH *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP
Ekspresi p65 DAN KADAR IL-1 β

(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Galur Wistar Model *Collagen Loss* yang
Dipapar Sinar UVB)

Disusun oleh
Yeni Nila Fristiani
MBK. 2322010422

Akan dipertahanakna di depan tim penguji
pada tanggal 15 Januari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

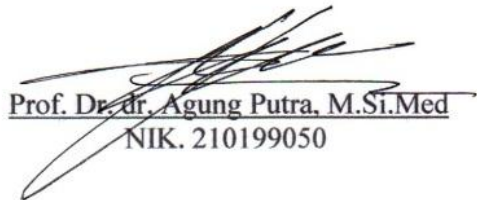
Menyetujui,

Pembimbing I,



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

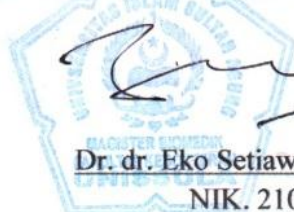
Pembimbing II,



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

Mengetahui,

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



Dr. dr. Eko Setiawan, S.pB, FINACS
NIK. 2101131160

PERNYATAAN

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

Semarang, 13 Agustus 2024



(Yeni Nila Fristiani)

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan proposal tesis yang berjudul: **PENGARUH *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI p65 DAN KADAR IL-1 β** (Studi Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus Galur Wistar Model *Collagen Loss* yang Dipapar Sinar UVB). Proposal tesis ini ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa proposal tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan penulisan proposal tesis ini. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, S.pB, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes, selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan proposal tesis.
5. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med, selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan proposal tesis.
6. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan proposal tesis.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan proposal tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, 13 Agustus 2024

(Yeni Nila Fristiani)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT.....	xvi
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	4
1.4. Manfaat penelitian	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Interleukin-1 β	9
2.1.1. Definisi IL-1 β	9
2.1.2. Mekanisme Molekuler IL-1 β pada <i>Collagen Loss</i>	9
2.2. P65.....	12
2.2.1. Definisi P65	12
2.2.2. Mekanisme Molekuler p65 pada <i>Collagen Loss</i>	12
2.3. <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	14
2.3.1. Fungsi MSCs	15
2.3.2. Mobilisasi MSC	16

2.3.3. Konsep <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSC.....	17
2.3.4. Induksi <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSC.....	19
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	27
3.1. Kerangka Teori.....	27
3.2. Kerangka Konsep	29
3.3. Hipotesis	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	30
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	31
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	33
4.3.1 Subyek Penelitian	33
4.3.2 Sampel Penelitian	33
4.3.3 Cara Pengambilan Sampel.....	34
4.3.4 Besar Sampel	35
4.4. Alat dan Bahan	35
4.4.1. Alat	35
4.4.2. Bahan	36
4.5. Prosedur Pelaksanaan Penelitian	37
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	37
4.5.2. Induksi <i>Collagen Loss</i>	37
4.5.3. Isolasi MSCs dari <i>Umbilical Cord</i> (UC)	38
4.5.4. Pemanenan dan Penghitungan MSCs	39
4.5.5. Validasi MSCs	40
4.5.6. Proses Hipoksia	43
4.5.7. Perlakuan pada Hewan Coba	43
4.5.8. Uji Ekspresi p65	43
4.5.9. Uji Kadar IL-1 β	46
4.6. Tempat dan Waktu Peneltian.....	47
4.7. Analisis Data	47
4.8. Alur Penelitian.....	48
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	49
5.1. Hasil Penelitian.....	49

5.1.1. Isolasi Hipoksia <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (HMSCs)	49
5.1.2. Validasi Hewan Model yang Diberi Paparan UVB	52
5.1.3. Efek Pemberian injeksi HMSCs terhadap ekspresi p65 pada tikus model <i>Collagen Loss</i>	54
5.1.4. Efek Pemberian injeksi HMSCs terhadap kadar IL-1 β pada tikus model <i>Collagen Loss</i>	57
5.1.5. Gambaran Makroskopis Efek Pemberian injeksi HMSCs pada tikus model <i>Collagen Loss</i>	61
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	63
5.3. Keterbatasan Penelitian	66
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	67
6.1 Kesimpulan	67
6.2. Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN	82



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	5
Tabel 2.1. Perbandingan perubahan histologis dan klinis yang terbukti pada penuaan kronologis dan Photoaging. ⁷⁶	21
Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam analisis <i>flow cytometry</i>	41
Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Ekspresi p65	54
Tabel 5.2. Perbedaan Rerata Ekspresi p65 Antar Dua Kelompok dengan Uji <i>Post-Hoc</i> LSD	55
Tabel 5.3. Data Hasil Kadar IL-1 β	58
Tabel 5.4. Perbedaan Rerata Kadar IL-1 β Antar Dua Kelompok dengan Uji <i>Post-Hoc</i> LSD	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam <i>collagen loss</i> yang dimediasi UV akibat aktivasi reseptor inflamasi (Ansary <i>et al.</i> , 2021). ³²	11
Gambar 2.2.	Kemampuan Diferensiasi dari MSC (Isakson <i>et al.</i> , 2015). ⁵⁵	15
Gambar 2.3.	Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC (Bagno <i>et al.</i> , 2022) ⁶⁹	19
Gambar 2.4	Lingkungan Hipoksia Mengaktivasi MSC (Haque <i>et al.</i> , 2013). ⁷⁰	20
Gambar 3.1.	Kerangka Teori Penelitian	29
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep Penelitian	29
Gambar 4.1	Alur Rancangan Penelitian	30
Gambar 4.2.	Alur penelitian	48
Gambar 5.1.	(A) Isolasi MSC dengan konfluensi 80% didapatkan gambaran sel berbentuk <i>spindle-like</i> (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 40x. (B) Analisis <i>flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31.	50
Gambar 5.2.	(A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) Adiposit setelah pemberian pewarna <i>alizarin red</i> dan <i>oil red o</i> pada perbesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam).	51
Gambar 5.3.	Validasi <i>Collagen Loss</i> . Tikus kelompok sehat tidak terlihat adanya kerutan (A), Tikus yang disinari UVB tanpa perlakuan lebih terlihat jelas adanya kerutan (B). <i>Staining</i> kolagen dengan <i>Masson Trichome</i> ditunjukkan dengan warna biru lebih banyak terlihat di tikus sehat (C), dibandingkan dengan tikus yang terpapar UVB dan tanpa perlakuan (D).	53
Gambar 5.4	Grafik Ekspresi p65 dengan menggunakan analisis qRT-PCR, kelompok sehat (tidak terpapar UVB), kelompok kontrol negatif (terpapar UVB dengan injeksi NaCl), kontrol positif (terpapar UVB dengan injeksi <i>hyaluronic acid</i>), P1 (terpapar UVB dengan dosis injeksi HMSCs 2.5×10^5 dalam NaCl 200µL), P2 (terpapar UVB dengan dosis injeksi HMSCs 5×10^5 dalam NaCl 200µL).	56

- Gambar 5.5 Grafik Kadar IL-1 β dengan menggunakan analisis ELISA, kelompok sehat (tidak terpapar UVB), kelompok kontrol negatif (terpapar UVB dengan injeksi NaCl), kontrol positif (terpapar UVB dengan injeksi *hyaluronic acid*), P1 (terpapar UVB dengan dosis injeksi HMSCs 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L), P2 (terpapar UVB dengan dosis injeksi HMSCs 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L). 60
- Gambar 5.6 Penampang makroskopis masing-masing kelompok setelah 1 minggu penyuntikan HMSC. (A) Gambaran makroskopis kulit tikus sehat (K1), (B) Gambaran makroskopis kulit tikus kontrol negative (K2), (C) Gambaran makroskopis kulit tikus kontrol positif (K3), (D) Gambaran makroskopis kulit tikus injeksi HMSCs dosis 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K4), (E) Gambaran makroskopis kulit tikus injeksi HMSCs dosis 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K5) 62



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	82
Lampiran 2. Surat Keterangan Penelitian	83
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian	86
Lampiran 4. Hasil SPSS	87



DAFTAR SINGKATAN

AP-1	: Activator Protein-1
BSC	: <i>Biological Safety Cabinet</i>
DAMP	: <i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ECM	: Matriks Ekstraseluler
H-MSC	: <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
Gpx	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
HA	: <i>Hyaluronic Acid</i>
IKK	: IκB kinase
IL-1β	: <i>Interleukin-1 beta</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IκB	: Inhibitor-NF-κβ
JNK	: c-Jun N-terminal Kinases
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MED	: <i>Minimal Erythematous Dose</i>
miRNA	: mikroRNA
MMP	: Matrix Metalloproteinase
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-κβ	: <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NF-κβ	: <i>Nuklear Factor Kappa B</i>
NfκB	: <i>Nuklir kappa B</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
RIPA buffer	: <i>RadioImmunoprecipitation Assay buffer</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TNFR1	: Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor -α</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
-α SMA	: <i>-α Smooth Muscle actin</i>

ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan UVB merupakan faktor utama penyebab terjadinya *photoaging*. Radiasi UVB secara terus-menerus akan menyebabkan berbagai perubahan pada kulit baik perubahan makroskopis seperti merah, kerutan dan hiperpigmentasi. Maupun perubahan mikroskopis seperti berkurangnya kolagen dilapisan dermis. Proses ini melibatkan aktivasi jalur NF- κ B khusus nya P65, dan peningkatan kadar IL-1 β . MSCs dengan prekondisi hipoksia (HMSCs) telah menunjukkan potensi sebagai anti inflamasi kuat, sehingga diyakini mampu menekan inflamasi akibat aktivasi jalur NF- κ B.

Tujuan Penelitian : penelitian ini bertujuan untuk menguji efek pemberian HMSCs terhadap ekspresi P65 dan kadar IL-1 β pada tikus galur wistar yang mengalami *collagen loss* akibat paparan UVB.

Metode : Penelitian adalah penelitian eksperimental *in-vivo* dengan desain *post-test only control grup* dengan metode rancangan acak lengkap. Subjek penelitian adalah tikus Jantan galur wistar berusia 2-3 bulan dengan berat 200-250 gram. Subjek dibagi kedalam 5 kelompok perlakuan yaitu, kelompok tikus sehat (K1), kelompok kontrol negatif (K2), kelompok kontrol positif (K3), kelompok yang diberikan HMSCs dosis $2,5 \times 10^5$ sel (K4), dan kelompok yang diberi HMSCs 5×10^5 sel. Ekspresi p65 di analisis dengan uji RT-qPCR dan kadar IL-1 β dianalisis dengan Elisa. Analisis data menggunakan *One way ANOVA*.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian H-MSCs secara signifikan mengurangi ekspresi p65 dan kadar IL-1 β ($p < 0,001$). Data menunjukan pada kelompok K4 dan K5 secara signifikan menurunkan kadar IL-1 β dibandingkan dengan kelompok K2, dengan kelompok K5 menunjukkan penurunan yang paling besar. Selain itu, injeksi H-MSCs pada kelompok K4 dan K5 secara efektif mengurangi tingkat ekspresi p65 NF- κ B dibandingkan dengan K2, di mana K5 memberikan penghambatan yang optimal.

Kesimpulan : Pemberian H-MSCs secara subkutan dengan dosis $2,5 \times 10^5$ sel dan 5×10^5 sel, mampu menurunkan ekspresi p65 dan kadar IL-1 β pada tikus model *collagen loss* yang di induksi UVB jika di bandingkan dengan kontrol negatif.

Kata Kunci: H-MSCs, p65, IL-1 β , UVB, kerusakan kolagen

ABSTRACT

Background : UVB exposure is a major factor causing photoaging. Continuous UVB radiation induces various changes in the skin, including macroscopic changes such as redness, wrinkles, and hyperpigmentation, as well as microscopic changes such as reduced collagen in the dermal layer. This process involves the activation of the NF- κ B pathway, particularly P65, and an increase in IL-1 β levels. Mesenchymal stem cells preconditioned with hypoxia (HMSCs) have shown potential as strong anti-inflammatory agents, making them a promising approach to suppress inflammation induced by NF- κ B pathway activation.

Objective : This study aims to evaluate the effects of HMSCs administration on P65 expression and IL-1 β levels in Wistar rats experiencing collagen loss due to UVB exposure.

Methods: This study was an in-vivo experimental study using a post-test only control group design with a completely randomized design. The subjects were male Wistar rats aged 2–3 months and weighing 200–250 grams. The subjects were divided into five groups: healthy control group (K1), negative control group (K2), positive control group (K3), the group receiving HMSCs at a dose of 2.5×10^5 cells (K4), and the group receiving HMSCs at a dose of 5×10^5 cells (K5). P65 expression was analyzed using RT-qPCR, and IL-1 β levels were analyzed using ELISA. Data were analyzed using One-Way ANOVA.

Results : Our data showed that the administration of H-MSCs in the K4 and K5 significantly reduced IL-1 β levels compared to the K2 group, with the K5 group showing the most substantial reduction. Moreover, H-MSCs injection in K4 and K5 groups effectively reduced p65 NF- κ B expression levels compared to the K2, in which K5 provides optimum inhibition.

Conclusion : Subcutaneous administration of HMSCs at doses of 2.5×10^5 cells and 5×10^5 cells effectively reduced P65 expression and IL-1 β levels in UVB-induced collagen loss model rats compared to the negative control group.

Keywords: H-MSCs, p65, IL-1 β , UVB, collagen loss

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Proses penuaan pada kulit merupakan permasalahan yang menarik perhatian, paparan sinar ultraviolet B (UVB) merupakan faktor utama penyebab *photoaging* yang menimbulkan perubahan patologis pada kulit seperti *sunburn*, eritema, dan hiperpigmentasi,¹ radiasinya menyebabkan peningkatan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan berujung pada penurunan kadar kolagen.² Peningkatan ROS memicu aktivasi *direct* jalur pensinyalan inflamasi utama, *Nuclear Factor kappa- β* (NF-K β) yang tersusun atas protein p65 dan p50, hingga berujung pada peningkatan produksi molekul pro-inflamasi, seperti *interleukin-1 beta* (IL-1 β).³ Sisi lain, aktivasi NF-K β juga berdampak pada peningkatan produksi enzim *matrix metalloproteinases* (MMPs) yang berujung pada penurunan kolagen.⁴ Penelitian terkini melaporkan bahwa *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (H-MSCs) mampu menghambat aktivasi jalur NF-K β secara *direct* melalui aktivitas parakrin, berupa produksi molekul anti-inflamasi, *exosome* dan *microvesicle*.⁵ Hal ini menunjukkan studi lebih lanjut diperlukan mengenai potensi H-MSCs dalam menghambat ekspresi p65 dan kadar IL-1 β pada tikus model *collagen loss*.

Penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa sekitar 80% orang di bawah usia 30 tahun mengalami tanda-tanda penuaan, seperti kerutan dan penurunan elastisitas kulit, akibat paparan UVB.⁶ Studi lain juga

mengungkapkan bahwa pada tahun 2020, terdapat peningkatan jumlah kasus kerutan dan penuaan, mencapai 100.000 kasus baru.⁷ Penelitian terkini menunjukkan bahwa sekitar 4% dari 142 subjek positif mengalami penurunan kolagen setelah terpapar UVB dengan *minimal erythema dose* (MED).⁶ Terapi standar yang biasa dilakukan untuk mengatasi penuaan kulit akibat paparan UVB antara lain dengan tabir surya yang melindungi kulit dari sinar matahari, serta penggunaan *hyaluronic acid* (HA) untuk mengurangi kerutan.⁸ Namun demikian, penggunaan HA hanya berperan sebagai moisturizer dan tidak memiliki peran antiinflamasi atau pun antioksidan yang kuat sehingga akan terjadi *reccurence* setelah penggunaan HA.⁹ Selain itu penggunaan jangka panjang produk perawatan kulit atau obat tertentu dapat menyebabkan ketergantungan dan sejumlah dampak negatif seperti iritasi, dan kemerahan.¹⁰

Penelitian terkini menemukan bahwa prekondisi hipoksia pada *Mesenchymal Stem Cell* meningkatkan pelepasan sitokin anti-inflamasi seperti interleukin-10 (IL-10) dan *growth factor* seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β), VEGF, *Platet Derived Growth Factor* (PDGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)^{11,12} yang dapat mencegah inflamasi melalui penekanan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β , melalui jalur NF-K β , khususnya p65.¹³ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa IL-10 dan VEGF dapat menekan kadar ROS melalui jalur NF-K β .^{14,15} Penelitian lain juga melaporkan bahwa beberapa ekspresi sitokin pro-inflamasi ditekan oleh IL-10 bersumber dari *human bone marrow derived mesenchymal stem cells*

yang diatur melalui NF- $\text{K}\beta$.^{16,17} Diseregulasi NF- $\text{K}\beta$ telah dibuktikan terlibat dalam patogenesis berbagai kasus inflamasi pada *collagen loss*.¹⁸ Memblok NF- $\text{K}\beta$ telah menunjukkan efek menguntungkan pada model hewan untuk penyakit dengan respon inflamasi termasuk *collagen loss*.^{19,20} Penelitian terbaru melaporkan bahwa *adipose-derived stem cells* menekan ekspresi IL-6, phospho-NF- $\text{k}\beta$ p65, and TNF- α yang berkaitan dengan melemahkan stress oksidatif melalui aktivasi *downstream signa transducer* dan *activator of transcription 3* (STAT3) untuk mencegah *photoaging*.^{21,22} Keunggulan pemberian HMSCs dibanding dengan senyawa lain diantaranya HMSCs memiliki kandungan bio molekul aktif yang tidak memiliki sifat imunogenisitas, tidak menimbulkan efek samping dan ukuran molekulnya yang kecil sangat mudah untuk diabsorpsi menembus barrier kulit menuju dermis.²³

Berdasarkan penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa HMSCs memiliki potensi sebagai agen alternatif untuk mencegah inflamasi karena mampu berperan dalam menurunkan *inflammatory milieu* akibat stres oksidatif UVB, namun potensi HMSCs dalam memperbaiki *collagen loss* akibat paparan UVB melalui hambatan produksi molekul pro-inflamasi dan jalur pensinyalannya belum pernah dilakukan. Berdasarkan studi tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh HMSCs terhadap ekspresi p65 dan kadar IL-1 β pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi paparan UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah “apakah terdapat pengaruh pemberian injeksi HMSCs terhadap ekspresi p65 dan kadar IL-1 β pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi paparan sinar UVB?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian injeksi HMSCs terhadap ekspresi p65 dan kadar IL-1 β pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi paparan sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menguji perbedaan ekspresi p65 pada tikus model *collagen loss* setelah pemberian injeksi HMSCs pada dosis $2,5 \times 10^5$ sel/200 μ L dan 5×10^5 sel/200 μ L dibandingkan kontrol.
2. Menguji perbedaan kadar IL-1 β pada tikus model *collagen loss* setelah pemberian injeksi HMSCs pada dosis $2,5 \times 10^5$ sel/200 μ L dan 5×10^5 sel/200 μ L dibandingkan kontrol.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teoritis adalah memberikan ilmu pengetahuan mengenai pengaruh pemberian HMSCs terhadap ekspresi p65 dan kadar IL-1 β pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi paparan sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat penelitian ini secara praktis adalah menjadi data dasar bagi penelitian terapan yang bermuara pada produksi produk HMSCs untuk terapi *collagen loss*. Penelitian lebih lanjut dapat di aplikasikan bagi masyarakat.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Cheng L, Liu J, Wang Q, Hu H, Zhou L., 2024 ¹	Efek Perlindungan Supernatan Sel Punca Mesenkim Tali Pusat Manusia pada Photoaging Kulit yang Diinduksi UVB	<i>In vitro</i> dan <i>In vivo</i> eksprimental	MSCs sebagai agen anti- <i>photoaging</i> . MSCs dapat menurunkan <i>wrinkles</i> dan sel <i>senescence</i> , meningkatkan ekspresi kolagen, dan meningkatkan system imun pada <i>skin damage</i> .
2	Yang Y, Lee E, Yang Z., 2022 ²³	Sel Punca Mesenkim yang Dikondisikan Hipoksia dalam Aplikasi Regenerasi Jaringan	<i>In vitro</i> eksprimental	HMSCs meningkatkan kemampuan proliferasi, survival, dan migrasi sel dengan beberapa variasi respon sel.
3	Mayasari YI, Subchan P, Putra A, Chodijah C, Hussana A, Sumawarati T, Amalina	Sel Punca Mesenkim Hipoksia Rahasia Menghambat Radiasi Ultraviolet dengan Menghambat	<i>In vivo</i> , eksprimental	Secretome HMSCs mengandung molekul bioaktif yang dapat menghambat ekspresi dari IL-6

	ND, Irawan RCS., 2023 ²⁴	Interleukin-6 melalui Jalur NF- K β pada Model Hewan Hiperpigmentasi		melalui jalur NF- K β . SH-MSCs mampu menurunkan ekspresi IL-6, p50, p65 yang terlibat dalam jalur NF-K β .
4	Yang Y, Wu Y, Yang D, Neo S, Kadir N., 2023 ²⁵	Sel Punca Mesenkim Prekondisi Hipoksia Mendorong Regenerasi Tulang Rawan dan Mengurangi Peradangan Sendi melalui Vesikula Ekstraseluler	<i>In vivo</i> , eksprimental	HMSCs terbukti dapat menurunkan proses inflamasi dengan <i>inhibit</i> IL- 1 β , degradasi matriks, dan aktivasi makrofag tipe 1.
5	Kou Z, Li B, Aierken A, Tan N, Li C, Han M, Jing Y, Li N, Zhang S, Peng S, Zhao X, Hua J., 2023 ²⁶	Sel Punca Mesenkim yang Dipreparasi dengan Kolagen Mempromosikan Penyembuhan Luka pada Kulit	<i>Clinical study</i> , eksprimental	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> yang dipreparasi kolagen mampu meningkatkan kecepatan penyembuhan luka kulit tikus dengan meningkatkan perbaikan lapisan epidermis, deposisi kolagen, dan respon inflamasi.

Penelitian terkini dari *in vitro* Cheng L, Liu J, Wang Q, Hu H, Zhou L., 2024 menggunakan sel HaCaT yang dipapar UVB mengungkapkan bahwa *human umbilical cord mesenchymal stem cell* dapat menghambat proliferasi sel dan mengarahkan pada penuaan sel (*cell senescence*).

Sedangkan penelitian *in vivo* berhasil menunjukkan MSCs dapat meningkatkan produksi kolagen. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini, karena penelitian ini lebih lanjut mengarahkan pada pengaruh pre-kondisi *hypoxia* MSCs terhadap ekspresi p65 dan kadar IL-1 β .

Yang Y, Lee E, Yang Z., 2022 mengungkapkan bahwa MSCs yang diberikan pre-kondisi *hypoxia* dapat meningkatkan efek terapeutik dari MSCs, pada kultur *in vitro* *hypoxia* mampu meningkatkan chondrogenesis. *Hypoxia* juga dapat menstimulasi aktivasi parakrin dan meningkatkan secretome ekstraseluler vesikel. Penelitian tersebut hanya sebatas mengetahui efek dari pre-kondisi *hypoxia* terhadap *mesenchymal stem cell*, belum mengungkapkan efek HMSCs pada *pathways* NF-K β dan IL-1 β .

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa hasil dari sekresi HMSCs memiliki beberapa molekul bioaktif yang mampu menghambat ekspresi dari molekul pro-inflamasi seperti IL-6, p65, p50 melalui jalur NF-K β , pada kasus hiperpigmentasi akibat paparan UVB (Mayasari YI, Subchan P, Putra A, Chodijah C, Hussana A, Sumawarati T, Amalina ND, Irawan RCS., 2023). Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini, karena penelitian tersebut menggunakan SHMSCs dan pada kondisi hiperpigmentasi, sedangkan penelitian ini menggunakan HMSCs pada kondisi *collagen loss*.

Penelitian Yang Y, Wu Y, Yang D, Neo S, Kadir N., 2023 membuktikan bahwa secretom HMSCs memiliki efek immunomodulator dengan menghambat ekspresi dari IL-1 β yang berperan sebagai molekul

pro-inflamasi, penghambatan tersebut dimediasi melalui aktivasi *hypoxia inducible factor 1α* (HIF-1α) yang diregulasi melalui beberapa sitokin dan *growth factors*. Penelitian tersebut menggunakan SHMSCs untuk *treatment*, sedangkan penelitian ini menggunakan HMSCs untuk melihat adanya perbedaan ekspresi p65 dan kadar IL-1β pada tikus dengan model *collagen loss*.

Kou Z, Li B, Aierken A, Tan N, Li C, Han M, Jing Y, Li N, Zhang S, Peng S, Zhao X, Hua J., 2023 menemukan bahwa *Mesenchymal Stem Cells* yang sebelumnya diberikan perlakuan kolagen mampu meningkatkan kecepatan penyembuhan luka kulit dengan meningkatkan perbaikan lapisan epidermis, deposisi kolagen, dan respon inflamasi. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini karena HMSCs akan diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan ekspresi p65 dan kadar IL-1β.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interleukin-1 β

2.1.1. Definisi IL-1 β

IL-1 adalah sitokin inflamasi yang terlibat dalam berbagai respons imunologis, yang mencakup imunitas bawaan dan adaptif.²⁷ Sitokin interleukin-1 β (IL-1 β) merupakan salah satu family dari IL-1 dan sebagai mediator utama respon inflamasi yang berperan penting dalam respon pertahanan terhadap patogen, *short-term inflammation* dan imunitas adaptif.²⁸ Akumulasi sitokin ini dalam jumlah yang besar juga memperburuk kerusakan selama penyakit kronis dan cedera jaringan akut.

IL-1 β memediasi inflamasi tidak hanya pada tingkat jaringan, tetapi juga secara sistemik, dimana salah satu aksinya adalah menginduksi respon fase akut, termasuk demam.²⁹ Inflamasi ini kemudian berkelanjutan dengan menginduksi sitokin proinflamasi lainnya, seperti IL-6 dan TNFa, dan menjembatani sistem imun *innate* dan adaptif dengan aktivasi sel Th1 dan Th17.³⁰ Interleukin-1 β memainkan peran penting dalam pertahanan host terhadap infeksi, dan dalam homeostasis dan perbaikan jaringan.³¹

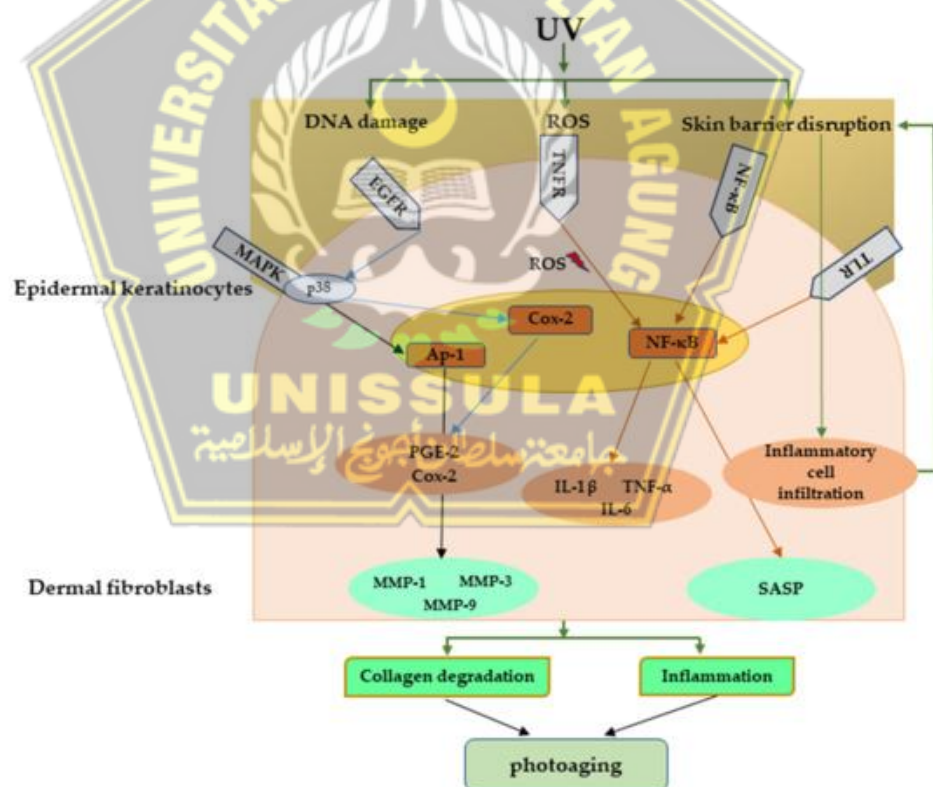
2.1.2. Mekanisme Molekuler IL-1 β pada *Collagen Loss*

Radiasi sinar UV dapat mengaktifkan persinyalan intraseluler melalui produksi ROS atau secara tidak langsung melalui kerusakan

DNA atau mitokondria yang kemudian memicu inflamasi.³² Pada kulit, keratinosit epidermal adalah sumber utama produksi sitokin dan fibroblas dermal adalah sumber utama metalloproteinase (MMP).³³ MMP merupakan endopeptidase yang ada di mana-mana dan berpartisipasi kuat dalam proses inflamasi dengan meregulasi aktivitas kemokin.³⁴ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa MMP berperan pada degradasi kolagen, terutama melalui MMP-1, MMP-3, dan MMP-9.³⁵ Studi melaporkan bahwa kerusakan DNA akibat paparan sinar UV menyebabkan pelepasan molekul inflamasi dari keratinosit epidermal meliputi IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , dan PDGF dan juga sekresi dari fibroblas dermal meliputi MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11, MMP-17, dan MMP-27.³⁶

Selain itu, akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) akibat paparan sinar UV memicu transduksi sinyal dan mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B).³⁷ NF- κ B merupakan mediator utama proses inflamasi seluler dan telah diketahui bahwa iradiasi UV dapat meningkatkan aktivitas transkripsi NF- κ B, yang menghasilkan sinyal inflamasi kronis.¹⁸ Berbagai stresor termasuk radiasi UV dapat mengaktifkan respon kerusakan DNA yang dapat memulai penghentian siklus sel melalui jalur p53/p21 yang melibatkan cascade P38/MAPK dan jalur NF- κ B.³² Telah ditunjukkan bahwa kulit manusia yang terpapar sinar UV memiliki

akumulasi sel-sel tua yang sangat tinggi. Akumulasi fibroblas tua dapat mempercepat penuaan kulit dengan mensekresi faktor-faktor fenotipe sekretori terkait penuaan (Senescence-Associated Secretory Phenotype/SASP), termasuk IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, dan MMPs.⁷ Faktor SASP yang disekresikan dari fibroblas tua bertanggung jawab atas peradangan kronis serta degradasi ECM, yang mengakibatkan degradasi kolagen dan inflamasi.³⁸ Gambar 2.1 menjelaskan jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam hiperpigmentasi yang diperantarai UV.³²



Gambar 2.1 Jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam *collagen loss* yang dimediasi UV akibat aktivasi reseptor inflamasi (Ansary *et al.*, 2021).³²

2.2. P65

2.2.1. Definisi P65

Protein p65 adalah salah satu unit protein dari subunit kompleks NF- κ B yang mengontrol transkripsi DNA, produksi sitokin, dan kelangsungan hidup sel.³⁹ Protein p65 ditemukan di hampir semua jenis sel hewan dan terlibat dalam respons seluler terhadap rangsangan seperti stres, sitokin, radikal bebas, logam berat, iradiasi ultraviolet, LDL teroksidasi, dan antigen bakteri atau virus.⁴⁰ Regulasi p65 NF- κ B yang salah telah dikaitkan dengan kanker, penyakit inflamasi dan autoimun, syok septik, infeksi virus, dan perkembangan kekebalan yang tidak tepat.⁴¹ Protein p65 juga terlibat dalam proses produksi ROS dan molekul proinflamasi akibat paparan UVB yang berujung pada *collagen loss*.³

2.2.2. Mekanisme Molekuler p65 pada Collagen Loss

Protein p65 NF- κ B diaktifkan pada sel kulit oleh radiasi UVB.³⁹ Secara spesifik, radiasi UVB berdampak pada akumulasi ROS yang berujung pada aktivasi kompleks NF- κ B dan menginduksi berbagai gen termasuk IL-1 β dan TNF α .³² Akumulasi molekul proinflamasi selanjutnya akan terus merangsang jalur transduksi sinyal untuk mengaktifkan p65 NF- κ B. Protein subunit NF- κ B juga diketahui menginduksi ekspresi gen *matrix metalloproteinase* (MMPs). MMPs terlibat dalam degradasi kolagen yang berujung pada *collagen loss*.⁴²

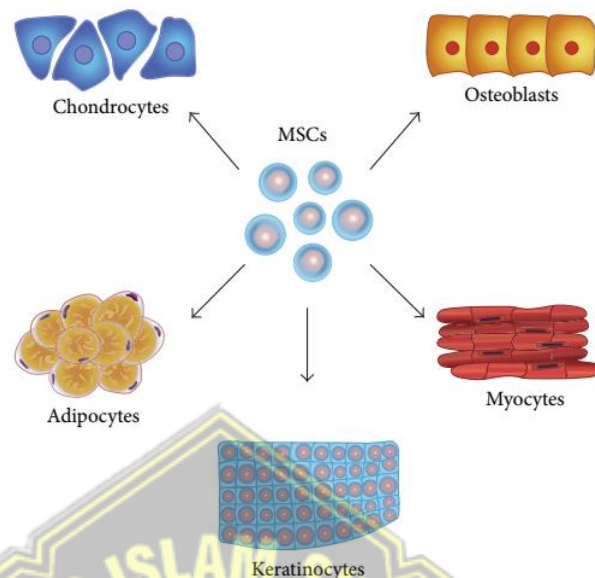
Subunit NF- κ B diketahui meningkatkan MMP-1 pada dermis melalui aktivasi subunit NF- κ B.⁴³ Ditemukan bahwa kadar MMP-1 dalam supernatan kultur sel meningkat dengan ekspresi berlebih dari subunit p65 NF- κ B.⁴⁴ Hal ini menunjukkan bahwa subunit p65 memainkan peran utama dalam produksi MMP-1 meskipun secara tidak langsung. Oleh karena itu, penghambatan jalur aktivasi NF- κ B akan memblokir jalur biologis yang mengarah ke inflamasi kronis, proses penuaan kulit hingga *collagen loss* yang ditimbulkan oleh iradiasi UV.⁴⁵

Subunit p65 NF- κ B adalah salah satu mediator utama dari proses inflamasi seluler dan diketahui bahwa iradiasi UV dapat meningkatkan aktivitas transkripsi NF- κ B, menghasilkan sinyal inflamasi kronis.³⁹ Keratinosit manusia yang disinari dengan UV menunjukkan peningkatan ekspresi sitokin inflamasi IL-1 β , IL-6, IL-8, dan TNF- α melalui jalur NF- κ B. TLR diekspresikan dalam keratinosit epidermis dan sel Langerhans dan sangat penting dalam identifikasi patogen dan respons imun.³² Telah ditunjukkan bahwa TLR memiliki fungsi penting dalam peradangan yang dimediasi UV melalui jalur pensinyalan hilirnya yang melibatkan NF- κ B.⁴⁶ Secara khusus, keratinosit yang rusak akibat sinar UV mensekresi RNA nonkode yang dapat mengaktifkan TLR3 dan menginduksi respon inflamasi, seperti TNF- α dan IL-6.⁴⁷ Epidermis kulit memiliki ekspresi TNFR yang dominan, dan TNF- α dapat mengaktifkan

berbagai jalur inflamasi melalui NF- κ B dan MAPK.⁴⁸ Telah dilaporkan bahwa penyinaran UV secara signifikan meningkatkan TNF- α yang larut dan panjang penuh dalam keratinosit epidermis.⁴⁹ Meskipun epidermis terus diperbarui dan apoptosis sel merupakan faktor penting untuk homeostasis epidermis, penting juga untuk dicatat bahwa apoptosis yang terganggu, prematur, atau berlebihan dapat menyebabkan disregulasi homeostasis epidermal dan meningkatkan fenotipe penuaan, seperti sel yang terbakar sinar matahari.⁵⁰ Telah terbukti bahwa TNF- α dapat menyebabkan apoptosis keratinosit melalui jalur reseptor TNFR-1 atau p55 yang diinduksi UV.⁵¹

2.3. *Mesenchymal Stem Cells*

MSCs dicirikan mempunyai kemampuan untuk memperbarui diri dan mampu berdiferensiasi ke dalam banyak garis keturunan jaringan, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit.⁵² MSC diperoleh dari sejumlah jaringan, termasuk sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat, MSC juga ditandai oleh ekspresi permukaan CD penanda, termasuk CD44+, CD73+, CD90 +, dan CD105+, dan dibedakan dari sel hematopoietik oleh kurangnya CD34, CD45, CD14, dan HLA-DR.⁵³ MSC kemampuan imunomodulator, reparatif, dan regeneratif melalui pensinyalan parakrin, yang memiliki potensi terapi yang besar.⁵⁴



Gambar 2.2. Kemampuan Diferensiasi dari MSC (Isakson *et al.*, 2015).⁵⁵

2.3.1. Fungsi MSCs

MSC berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Hal ini dikarenakan stem cell memiliki kemampuan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi serta mampu untuk menghasilkan berbagai produk seperti faktor pertumbuhan dan sitokin.⁵⁶ Stem cell juga mampu berkomunikasi secara parakrin maupun autokrin melalui sitokin yang dihasilkan.⁵⁷ Kemampuan stem cell berkomunikasi secara parakrin yaitu dengan cara menstimulasi pengaktifan sel lain dalam proses penyembuhan.⁵⁸ 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.⁵⁹

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 jaringan⁶⁰, diantaranya adalah:

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

2.3.2. Mobilisasi MSC

Sudah dibuktikan bahwa MSC, ketika ditransplantasikan secara sistemik, menunjukkan kemampuan untuk menuju ke lokasi kerusakan jaringan pada hewan coba. Hal ini menunjukkan bahwa MSC memiliki kapasitas untuk bermigrasi.⁶¹ Mekanisme migrasi MSC masih tetap belum jelas. Reseptor kemokin serta ligannya dan molekul adhesi memainkan peranan yang penting dalam mekanisme *homing* pada jaringan yang spesifik melalui leukosit.⁶² Banyak penelitian telah melaporkan ekspresi fungsional berbagai reseptor

kemokin dan molekul adhesi pada MSC manusia.⁶³ Memanfaatkan potensi migrasi dari MSC oleh modulasi interaksi reseptor kemokin merupakan cara yang ampuh untuk meningkatkan kemampuan MSC untuk memperbaiki kelainan bawaan dari jaringan *mesenchymal* atau memfasilitasi perbaikan jaringan *in vivo*.⁶³

Mediator sinyal akan dilepaskan oleh suatu jaringan yang rusak yang tujuannya untuk memobilisasi MSC agar menuju ketempat jaringan yang rusak tersebut.⁶⁴ 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 .⁶⁵

2.3.3. Konsep *Small Molecule Growth Factor* MSC

Terminologi fungsional MSC didasarkan pada kemampuannya dalam menskresi berbagai *soluble molecule* secara parakrin.⁵⁴ Konsep parakrin adalah komunikasi MSC dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepaskan oleh MSC.⁶⁶ Secara spesifik, konsep *small molecule growth factor* MSC didasarkan pada:⁶⁷

1. Kompleksitas teknik isolasi MSC

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

2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat

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

3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi

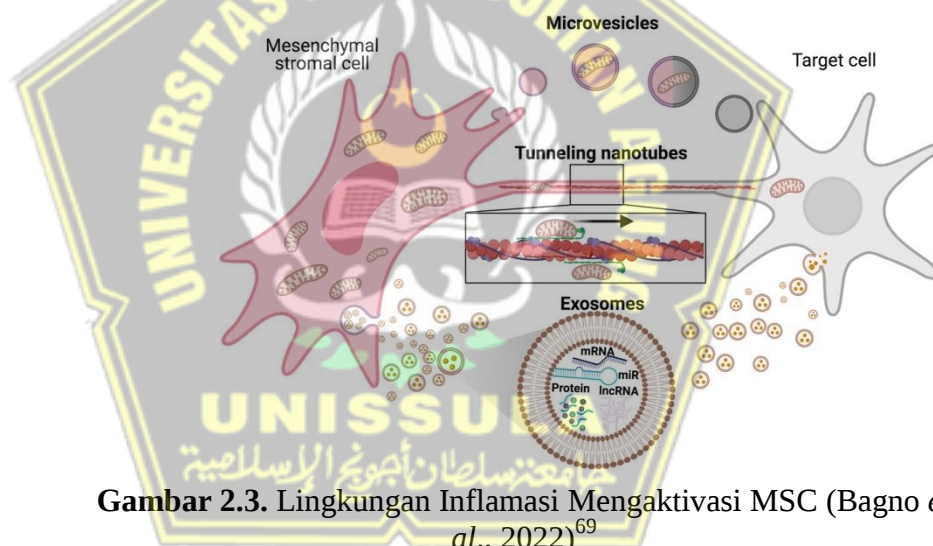
Laporan penelitian terkini mengungkapkan bahwa sebagian besar MSC yang diberikan lewat intravena akan terjebak dalam paru sebagai *small* emboli (tidak menimbulkan oklusi vaskuler). Sekalipun demikian, MSC yang terjebak tersebut tetap akan melepaskan berbagai molekul antiinflamasi, disamping pro-regenerasi.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

2.3.4. Induksi *Small Molecule Growth Factor* MSC

Begitu pentingnya peranan *small molecule growth factor* MSC ini, sehingga memunculkan berbagai upaya dalam menghasilkan *small molecule* ini secara *in-vitro*.⁶⁸ Secara spesifik induksi *small molecule growth factor* MSC dapat dibagi menjadi 2 yaitu:⁵⁴

1. Induksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi

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

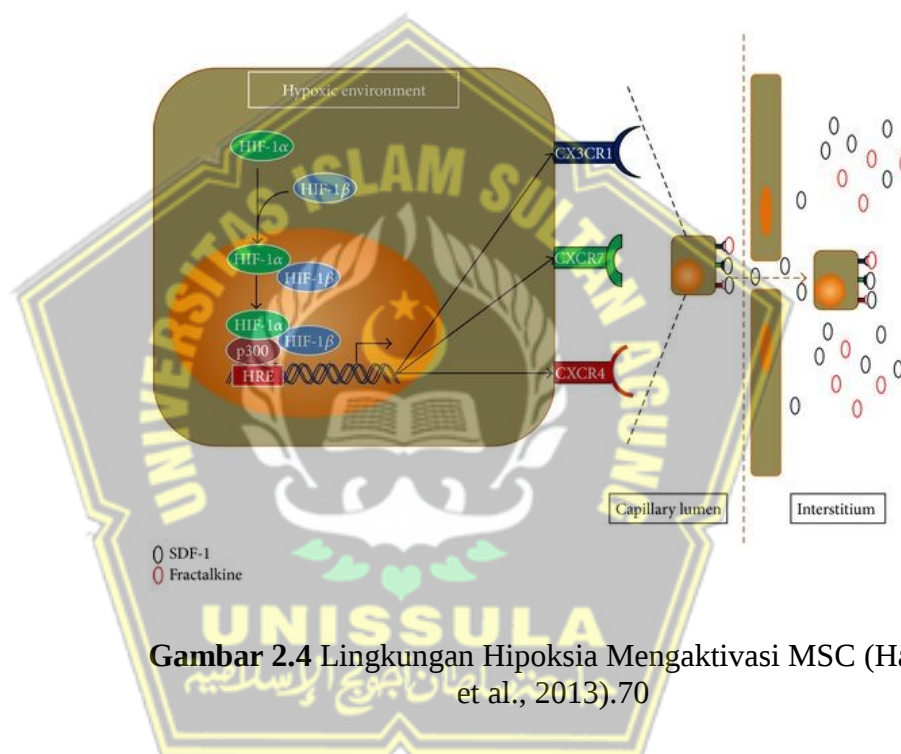


Gambar 2.3. Lingkungan Inflamasi Mengaktivasi MSC (Bagno *et al.*, 2022)⁶⁹

2. Induksi MSC dengan teknik hipoksia

MSC yang diinkubasi dalam keadaan hipoksia akan melepaskan berbagai molekul pro-regenerasi. Hal ini memunculkan teori *hypoxic preactivated MSC-induced soluble molecule* yaitu berbagai molekul terlarut dalam medium dilepas MSC yang mengalami hipoksia. Kondisi hipoksia pada MSCs

diketahui dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan ekspresi berbagai macam antioksidan, seperti GPX, superoxide dismutase (SOD)1, SOD2, catalase (CAT) dan sirtuin (SIRT)1 dan 3. Produksi IL-10 oleh MSCs dapat menghambat faktor transkripsi nuclear factor kappa B yang merupakan pemicu overekspresi ROS.



Gambar 2.4 Lingkungan Hipoksia Mengaktivasi MSC (Haque et al., 2013).⁷⁰

2.4 Ultraviolet B (UVB)

Radiasi ultraviolet (UV) sinar matahari dibagi menjadi UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) dan UVC (200–280 nm). Sekitar 90% Sinar UV yang mencapai bumi merupakan UVA, 10% merupakan UVB, sedangkan UVC seluruhnya diserap oleh atmosfer bumi.⁷¹ Berdasarkan kedua UV yang mampu menembus permukaan bumi, UVB merupakan UV

yang dapat menembus epidermis dan mencapai bagian atas dermis dan dapat menginduksi kerusakan DNA sel-sel kulit dengan meningkatkan konsentrasi *Reactive Oxygen Species* (ROS).⁷² Paparan jangka panjang terhadap UVB dapat menyebabkan photoaging yang memfasilitasi penuaan kulit dan melanogenesis.⁷³

2.4.1. Photoaging

Photoaging merupakan penuaan kulit ekstrinsik yang menyebabkan penuaan dini pada kulit melalui paparan kumulatif radiasi ultraviolet (UV) dari Matahari maupun sumber UV buatan.⁷⁴ Photoaging secara klinis ditandai dengan warna kulit yang tidak merata (hiperpigmentasi), rona kulit yang memucat kekuningan, kerutan (bisa halus, kasar atau keduanya), kulit yang atrofi, kulit menjadi kendur, telangiektasis, solar elastosis, actinic purpura, hingga pembentukan lesi prakanker, kanker kulit, dan melanoma.⁷⁵

Tabel 2.1. Perbandingan perubahan histologis dan klinis yang terbukti pada penuaan kronologis dan Photoaging.⁷⁶

	Kronologi <i>aging</i>	Photo- <i>aging</i>
Histologi	Susunan kolagen yang tidak beraturan, atrofi epidermis dan hilangnya kemampuan untuk sintesis kolagen. Downregulasi sel-sel penanda inflamasi.	Elastosis fragmentasi kolagen, ketebalan epidermis yang tidak teratur, peningkatan glikosaminoglikan dan proteoglikan. Upregulasi sel-sel marker inflamasi (sel mast, eosinophil, sel mononuklear).
Klinis	Penipisan kulit, kerutan dan garis halus, xerosis, angioma, dan keratosis seboroik.	Kulit atrofi, kerutan dan kulit kasar, dermatitis, memar.

Sinar UV yang mencapai lapisan dermis lebih banyak pada kulit yang berwarna cerah dibandingkan dengan kulit berwarna gelap sehingga individu dengan tipe kulit Fitzpatrick rendah cenderung lebih rentan terhadap *photoaging*.⁷⁷ Terdapat enam tipe warna kulit yang diklasifikasikan Fitzpatrick berdasarkan reaksinya terhadap paparan sinar matahari serta radiasi sinar UV, mulai dari sangat pucat (tipe kulit I) hingga sangat gelap (tipe kulit VI).⁷⁸ Warna alami atau pigmentasi kulit ditentukan oleh jumlah, tipe dan susunan melanin di kulit. Pigmen melanin memberikan perlindungan alami terhadap paparan sinar UV yakni *Sun Protection Factor* (SPF).⁷⁹ Kulit yang gelap lebih tahan terhadap kerusakan kulit akibat paparan sinar UV dikarenakan kulit yang lebih gelap memiliki SPF alami yang lebih tinggi yakni 13,4 jika dibandingkan kulit bangsa Kaukasia yang hanya memiliki SPF alami 3-4 atau bahkan kurang, sehingga manifestasi penuaan kulit lebih ringan dan terjadi lebih lambat 10 hingga 20 tahun dibandingkan dengan kulit yang lebih terang.⁸⁰

2.4.2. Kolagen

Kolagen merupakan salah satu makromolekul atau protein matriks ekstraseluler vertebrata (ECM) yang paling banyak dan kompleks. Sekitar 30 kolagen yang berbeda secara genetik diekspresikan dalam jaringan ikat manusia, jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia.⁸¹ Sebagian besar,

urutan mayoritasnya berupa heliks rangkap tiga (*triple helices*), yang membuatnya unik di antara protein. Heliks rangkap tiga adalah konformasi protein seperti tali yang kaku, yang tergantung pada jenis kolagennya, dapat diselingi antara daerah heliks non-triple fleksibel kecil, atau daerah non-kolagen globular yang lebih besar.⁸² Daerah triple heliks terdiri dari pengulangan tripeptida Gly-XY yang berdekatan, dengan residu Gly yang didukung pada posisi ini karena mereka cukup kecil untuk menyesuaikan batas tiga rantai peptida yang membentuk triple helix.⁸³

Kolagen terdiri dari beberapa jenis, salah satunya adalah kolagen tipe I yang paling melimpah di jaringan mamalia.⁸⁴ Sekitar 80-90% dari kolagen yang ditemukan di tubuh merupakan kolagen tipe I. Kolagen-1 merupakan jenis serabut kolagen terbanyak yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit.⁸⁵ Serabut kolagen-1 berperan penting dalam pembentukan jaringan parut. Kolagen tipe I juga terkait dengan interaksi sel, migrasi, perlekatan, diferensiasi, dan organisasi.⁸⁶ Kolagen-2, kolagen-9, kolagen-10, kolagen-11 ditemukan pada kartilago.⁸⁷ Kolagen-3 banyak dijumpai pada kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. Kolagen-3 penyebarannya hampir sama dengan kolagen-1.⁸⁸ Sedangkan kolagen-7 kebanyakan lokasinya

terletak pada *anchoring fibril* di *dermal epidermal junction* pada kulit, mukosa dan servik. Kolagen-7 juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah.⁸⁹

Kolagen merupakan bagian terbesar dari lapisan dermis, berkontribusi sekitar 75% dari massa kering kulit serta berperan memberikan kekuatan tarik dan elastisitas, sehingga kerusakannya merupakan penyebab utama manifestasi penuaan kulit.⁹⁰ Penelitian-penelitian sebelumnya membuktikan bahwa tipe kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen-1 (membentuk 80 – 90% dari total kolagen) dan kolagen-3 (membentuk 8 – 12 % dari total kolagen) yang berfungsi pada pertahanan mekanik.⁹¹ Akan tetapi tipe kolagen lain yang juga ada pada kulit, seperti kolagen-5, kolagen-6, kolagen-7, kolagen-12 ditemukan dalam jumlah minimal yang diperkirakan ikut menunjang, akan tetapi peran yang pasti belum jelas.⁸⁴

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast kulit yang mengalami kerusakan akibat UV.⁹² Pada kulit yang terlindungi sinar matahari dengan kolagen Tipe I yang terdegradasi sebagian diperoleh melalui percobaan *in-vitro* kolagen yang dicampur dengan MMPs yang diinduksi oleh sinar Ultraviolet, yang terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu; mekanisme secara langsung terjadi degradasi kolagen oleh MMPs (menghasilkan kolagen yang terfragmentasi dan tidak teratur) dan

secara tidak langsung melalui hambatan sintesis kolagen oleh degradasi kolagen yang terbentuk dari MMPs (yang mengakibatkan hilangnya kandungan kolagen).⁹³ Kolagen tipe I yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya. Paparan UV berulang menyebabkan akumulasi kerusakan kolagen yang akhirnya bermanifestasi menjadi penuaan kulit berupa kerutan (wrinkle), hilangnya elastisitas, dan kekenduran (sagging).⁹⁴

2.5. Pengaruh HMSCs terhadap Ekspresi IL-1 β dan p65 Tikus Model *Collagen Loss*

MSCs prekondisi hipoksia mensekresikan sitokin anti-inflamasi seperti IL-10, TGF β , NO dan IL-1RA.⁹⁵ Produksi IL-10 oleh MSCs dapat menghambat faktor transkripsi NF-K β yang merupakan pemicu overekspresi ROS.¹⁶ Secara spesifik, penghambatan NF-K β tersebut dapat dilakukan melalui ekspresi protein SOCS3 yang mempunyai situs pengikatan aktif terhadap kompleks NF-K β , sehingga translokasi NF-K β menuju nukleus dapat dihambat.⁹⁶

Paparan terhadap radiasi UVB dapat menginduksi penuaan kulit dini (*photoaging*) dan penurunan kadar kolagen dermal.⁷ Mekanisme molekuler yang terlibat dalam *photoaging* yang diinduksi UVB termasuk kerusakan DNA, produksi ROS yang berujung pada inflamasi berkelanjutan.³² Jalur pensinyalan NF κ B memainkan peran penting dalam respons terhadap produksi ROS yang diinduksi UVB di kulit.⁹⁷ Iradiasi UVB menginduksi respon sinyal inflamasi melalui aktivasi faktor transkripsi, NF- κ B yang

kemudian akan meningkatkan produksi ROS disamping sitokin proinflamasi.³² ROS secara normal mampu mengaktivasi pathway NF- κ B untuk memproduksi berbagai protein proinflamasi, seperti IL-1 β , TNF- α , IL-6 dan IFN- γ . Paparan UVB yang berlebih berdampak pada ketidakseimbangan kadar ROS dan antioksidan *intraseluler*, serta produksi IL-1 β berlebih, sehingga berujung pada *photoaging* dan *collagen loss*.⁹⁸

Sitokin IL-10 yang berasal dari HMSCs dapat mencegah secara langsung ekspresi ROS⁶³. IL-10 mengaktivasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentraslokasi kedalam nucleus untuk menggiring ekspresi gen responsive STAT3, antara lain *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3).⁹⁹ Melalui sintesis SOCS3, IL-10 dapat menghambat ekspresi sejumlah gen proinflamasi termasuk gen sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ . SOCS3 juga menghambat aktivasi MAPK dan translokasi NF- κ B kedalam nukleus sehingga mensupresi ekspresi gen proinflamasi.¹⁰⁰ Kandungan lain dari HMSCs adalah TGF- β yang terbukti secara signifikan mengaktifasi fosforilasi SMAD2/3 untuk masuk ke nucleus dan menginduksi ekspresi sitokin antiinflamasi.¹⁰¹ Maka dengan adanya HMSCs, merupakan kandidat yang mampu mengatasi *collagen loss*.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

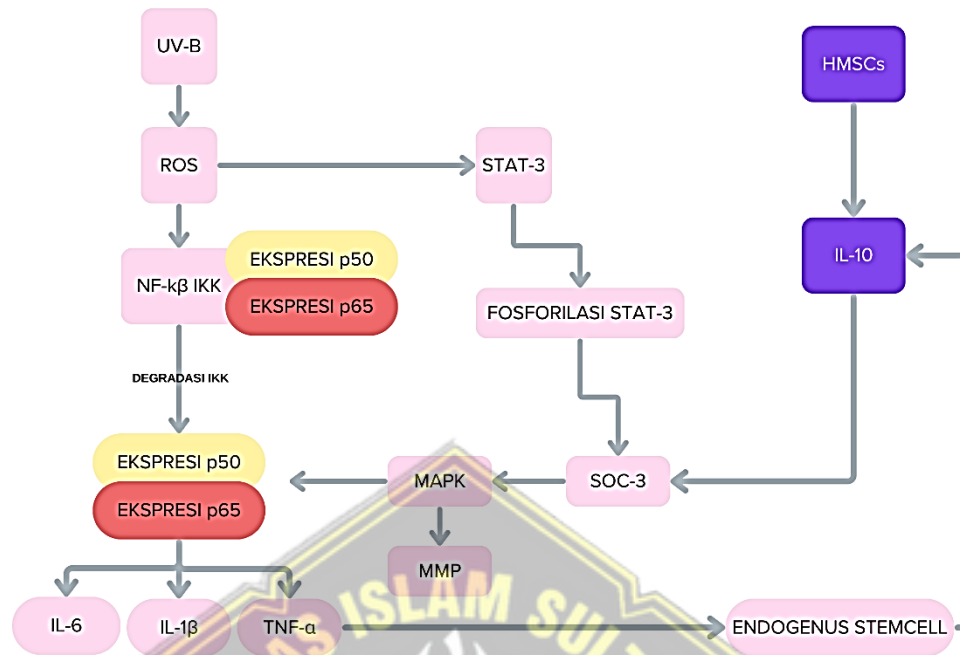
3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB dari sinar matahari menginduksi peningkatan produksi ROS yang kemudian akan menfosforilasi IKK.³⁷ Fosforilasi ini akan menyebabkan IKK terfosforilasi dan membentuk kompleksi dengan subunit p50 dan p65.³⁹ Sub-unit ini akan menyebabkan degradasi IKK akibat peran ubiquitin. Sehingga sub-unit p50/p65 akan masuk ke dalam inti sel dan menyebabkan transkripsi sitokin inflamasi.⁴⁰ Peningkatan ROS juga akan mengaktivasi STAT3 untuk terfosforilasi dan menginduksi translokasi ke nucleus hingga mentranskripsi SOCS3. SOCS3 akan menaktifkan MAPK yang akan meningkatkan aktivasi NF- κ B. ROS secara normal mampu mengaktivasi pathway NF- κ B untuk memproduksi berbagai protein proinflamasi, seperti IL-1 β , TNF α , IL-6 dan IFN γ . Paparan UVB yang berlebih berdampak pada ketidakseimbangan kadar ROS dan antioksidan intraseluler, serta produksi IL-1 β berlebih, sehingga berujung pada *photoaging* dan *collagen loss*.¹⁰²

Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal.¹⁰³ Sitokin-sitokin dan mediator-mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10, IL-6, IL-1, TGF β , TGF α , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-CSF, TNF, IGF-1, dan HGF.¹⁰⁴ Pada penelitian ini

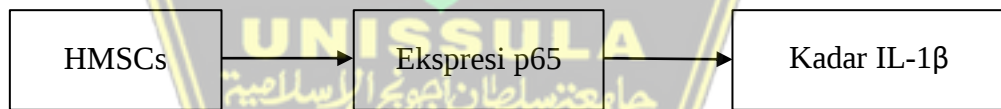
HMSCs diberikan secara subkutan pada daerah yang mengalami *collagen loss* hasil induksi iradiasi UVB. Aktivitas HMSCs akan turut mencegah produksi ROS akibat peran IL-10, mengaktifasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentraslokasi kedalam nukleus untuk mengarahkan pada ekspresi gen *responsive* STAT3, yaitu SOCS3. SOCS3 juga menghambat aktivasi MAPK dan translokasi NF- κ B kedalam nucleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen pro-inflamasi.¹⁰⁵ Kandungan lain dari HMSCs adalah TGF- β yang terbukti secara signifikan mengaktifasi fosforilasi SMAD2/3 untuk masuk ke nucleus dan menginduksi ekspresi sitokin antiinflamasi. IL-10 S-MSCs juga dapat menghambat ekspresi sejumlah gen proinflamasi termasuk gen sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ .¹⁰⁶ Adanya HMSCs, dapat mencegah *collagen loss* akibat iradiasi UVB.

MSCs saat diprekondisi hipoksia juga mampu meningkatkan sekresi molekul anti-inflamasi IL-10 dalam jumlah yang tinggi.¹⁰⁷ IL-10 mampu menurunkan kadar ROS melalui penghambatan NF- κ B pathway via *Supressor of Cytokine Signalling-3* (SOCS3).¹⁰⁸ Secara spesifik, penghambatan NF- κ B tersebut dapat dilakukan melalui ekspresi protein SOCS3 yang mempunyai situs pengikatan aktif terhadap kompleks NF- κ B, sehingga translokasi NF- κ B menuju nukleus dapat dihambat.²⁰ Mekanisme tersebut berujung pada penurunan kadar ROS intraseluler dan berbagai molekul proinflamasi, seperti IL-1 β , yang berujung padahambatan *photoaging* dan peningkatan persentase kolagen pada kulit.³



Gambar 3.1. Kerangka Teori Penelitian

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep Penelitian

3.3. Hipotesis

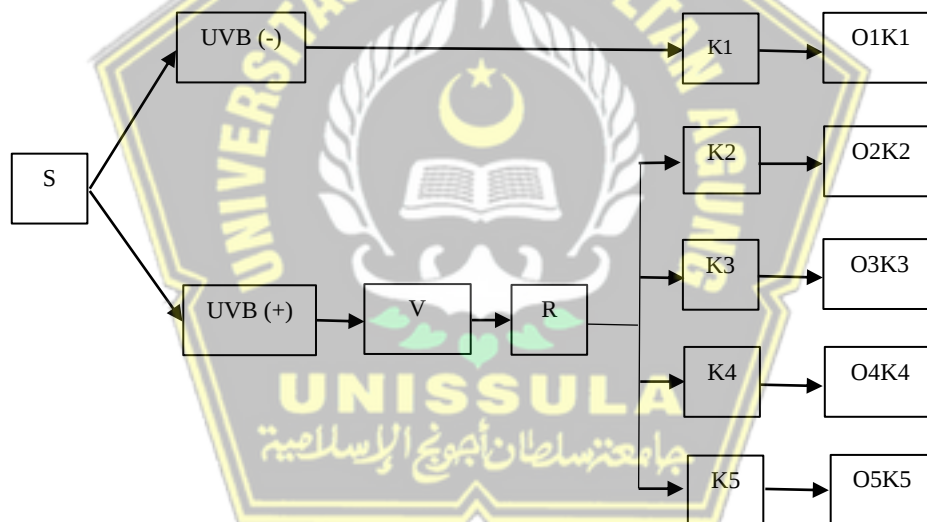
- 1 Terdapat pengaruh pemberian injeksi HMSCs terhadap ekspresi p65 dan IL-1 β pada tikus model *collagen loss* setelah pemberian injeksi HMSCs pada dosis $2,5 \times 10^5$ sel/200 μ L dan 5×10^5 sel/200 μ L dibandingkan kontrol.

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 250 ± 25 g. Perlakuan pada penelitian ini terdiri dari:



Gambar 4.1 Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

- S : Sampling
- R : Randomized
- UVB (+) : Pemberian paparan UVB
- UVB (-) : Tanpa paparan UVB
- V : Validasi pembentukan animal model penurunan kolagen
- K1 : Tikus sehat tanpa paparan UVB

- K2 : Kontrol Negatif (Tikus yang dipapar UVB diberi injeksi Natrium Chloride 0.9% dengan dosis 200 μ L secara subkutan)
- K3 : Kontrol Positif (Tikus yang dipapar UVB mengalami penurunan kolagen dengan perlakuan pemberian *Hyaluronic acid* dosis 200 μ L)
- K4 : Perlakuan 1 (Tikus yang dipapar UVB diberi injeksi H- MSC dosis 2.5×10^5 sel dalam 200 μ L NaCl secara subkutan)
- K5 : Perlakuan 2 (Tikus yang dipapar UVB diberi injeksi H- MSC dosis 5×10^5 sel dalam 200 μ L NaCl secara subkutan)
- O1K1 : Observasi ekspresi p65 dan kadar IL-1 β kelompok 1
- O2K2 : Observasi ekspresi p65 dan kadar IL-1 β kelompok 2
- O3K3 : Observasi ekspresi p65 dan kadar IL-1 β kelompok 3
- O4K4 : Observasi ekspresi p65 dan kadar IL-1 β kelompok 4
- O5K5 : Observasi ekspresi p65 dan kadar IL-1 β kelompok 5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah injeksi HMSCs dosis 2.5×10^5 sel dan 5×10^5 sel dalam 200 μ L NaCl secara subkutan.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung yang dikaji dalam penelitian ini adalah ekspresi gen NF-k β p65 dan kadar IL-1 β .

3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah sinar UVB pada tikus.

4.2.2. Definisi Operasional

1. Dosis Injeksi HMSCs

HMSCs adalah MSCs yang diberlakukan prekondisi hipoksia 5% selama 24 jam. HMSCs mengekspresikan CD90 dan CD44, serta tidak mengekspresikan CD45 dan CD31. Dosis HMSCs yang digunakan adalah 2.5×10^5 sel dan 5×10^5 sel dalam 200 μ L NaCl secara subkutan. Unit : Sel per mikroliter (sel/ μ L), Skala : Ordinal.

2. Ekspresi p65

Ekspresi p65 adalah jumlah ekspresi relatif mRNA p65 yang diproduksi jaringan kulit pada sampel penelitian. Ekspresi p65 dianalisis menggunakan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Unit : mutiple (x), Skala : Rasio

3. Kadar IL-1 β

Kadar IL-1b adalah jumlah absolut protein IL-1b yang terkandung dalam jaringan kulit pada sampel penelitian. Ekspresi IL-1b dianalisis 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

Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur *wistar* berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 250 ± 25 g yang dinyatakan layak digunakan untuk 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 penelitian adalah tikus jantan putih galur *wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Usia 2-3 bulan;
2. Kondisi sehat
3. Bobot badan 200 ± 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 penelitian ini dilakukan menggunakan teknik *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *wistar* dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus K1 (tidak diberi perlakuan), K2 (dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi $200 \mu\text{L NaCl}$), K3 (dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi $200 \mu\text{L HA}$), K4 (dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi HMSCs dosis 2.5×10^5 dalam $200 \mu\text{L NaCl}$), dan K5 (dipapar UVB dosis 160 mJ/cm^2 dengan jarak 20 cm lima hari seminggu selama dua minggu dan diberi HMSCs dosis 5×10^5 dalam $200 \mu\text{L NaCl}$). Pengambilan sampel jaringan kulit untuk validasi dan observasi dilakukan satu kali pada satu tikus di hari ke 14 setelah paparan UVB dan hari ke 22 setelah treatment HMSCs. Jaringan kulit disimpan dalam buffer formalin 10% dan suhu normal untuk pemeriksaan *masson fontana 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 mengikuti kriteria *federer* yaitu sebanyak 5 ekor per kelompok, sehingga jumlah sampel minimal pada penelitian ini adalah 25 ekor tikus wistar. Penghitungan besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini dilakukan menggunakan rumus sampel eksperimental *Federer* 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

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip)*, *pippete filler*, *conical tube* 15ml dan 50 ml, *cryotube* 1 ml, *haemocytometer*, *inverted microscope*, *CO₂ cylinder*, *N₂ cylinder scissor*, *pinset*, *scalpel*, *bistouri*, *sputit* berbagai ukuran, *thermostirrer*, sentrifuse dingin (Thermo, USA), minor set, pot jaringan, gelas beker, flask T75 (Corning, Life Sciences, USA), *aluminium foil*, *disk*, *well plate*, *dissposable pipet*, *heparin tube* (BD Vacutainer, Oxford, UK),

conical tube, cryo tube, haemocytometer, cell counter, biosafety cabinet Class 2, CO₂ incubator (Thermo, USA), hypoxia chamber, tempat penyimpanan sampel (refrigerator) dengan temperatur -20⁰C dan -80⁰C, 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 IL-1 β (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 p65 dan β -actin.

Bahan untuk isolasi MSCs diantaranya adalah umbilical cord tikus, medium alfa MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), trypsin (Sigma, St. Louis, MO, USA), fungizon 1%, tripan blue (Sigma, St. Louis, MO, USA), NaCl 0,9%, PBS (Phospat Buffer Salin) (Gibco BRL, Grand

Island, NY, USA), Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO, USA) alkohol 70%, 80%, 95% dan 100% (Merck-Millipore, Australia), streptomisin-penisilin 1% (penstrep) dan xylol (Merck-Millipore, Australia). Bahan untuk 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*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi. Tikus bunting usia 21 hari dianestesi dengan menggunakan anestesi dosis lethal dengan 10 mL cocktail digunakan Ketamine 50 mg/kgBB, Xylazine 10 mg/kgBB dan Acepromazine 2 mg/kgBB yang diisuntikkan secara intramuscular, 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 dikumpulkan dan disimpan dalam cawan petri yang mengandung 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 komplit 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* komplit 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 konfulensi 80%.

4.5.4. Pemanenan dan Penghitungan MSCs

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

mencapai konfluen 80% dipanen.

Penghitungan sel dilakukan dengan mengambil 10 μ l sel dan dimasukan ke cryotube menggunakan pipet, kemudian ditambahkan tripan blue (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 90 μ l ke dalam cryotube, selanjutnya ambil 10 μ L dan masukkan ke bilik hitung (hemocytometer) yg sudah ditutup dengan deck Glass, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop inverted (Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany) pada 4 bilik hitung. Hitung jumlah sel dengan menggunakan rumus berikut:

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

4.5.5. Validasi MSCs

1. *Imunophenotyping* dengan menggunakan Flow Cytometry

Identifikasi immunophenotype MSC tikus dilakukan dengan memeriksa ekspresi CD29, CD31, CD 45 dan CD90 menggunakan metode pemeriksaan flowcytometry. Sel dilepaskan dari flask menggunakan tripsin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) atau larutan detachment solution yang lain. Selanjutnya, sel dengan konsentrasi 1×10^7 sel /mL dicuci dan diresuspensi menggunakan BD Pharmingen™ Stain Buffer (cat. No. 554656) atau PBS tripsin 1 ml (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Apabila jumlah sel terbatas, sel dapat

diresponsensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/mL. Tabung falcon 5 ml disiapkan dengan menambahkan reagen pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam analisis *flow cytometry*

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

Tabung 5 sampai 7 diulangi untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis. Sampel diambil 100 μ l ke dalam masing-masing tabung untuk divortex atau tapping. Sel diinkubasi selama 30 menit suhu ruang, dalam ruang gelap dan dicuci sebanyak 2 kali dengan stain buffer (PBS) dan diresponsensi dengan 300-500 μ l *stain bufer* (PBS) atau 1 kali washing buffer (FBS). Tabung 1-5 sebagai kontrol untuk set up cytometry (sebagai kompensasi) pada pembacaan analisis *flow cytometry*.

2. Uji Diferensiasi MSCs

MSCs dikultur dengan kepadatan 2×10^4 sel /well. Sel ditumbuhkan dalam 24 well plate dengan media standar yang

mengandung DMEM (Gibco TM Invitrogen, NY, USA), dilengkapi dengan 10% FBS (Gibco TM Invitrogen, NY, USA) dan 1% penisilin (100 U / mL) / streptomisin (100 µg/mL) (Gibco TM Invitrogen, NY, USA) pada suhu 37°C, 5% CO₂ dan kelembapan $\geq$ 95%. Setelah 80% konfluen, media standar disedot dan diganti dengan media diferensiasi osteogenik yang mengandung Media Basal Diferensiasi Osteogenik MesenCult TM (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) ditambah dengan 20% Suplemen Diferensiasi Osteogenik MesenCult TM 5X (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) dan 1% L-Glutamine (Gibco TM Invitrogen, NY, USA). Media diferensiasi diperbarui setiap 3 hari. Setelah terbentuk matriks tulang selama kurang lebih 21 hari, diferensiasi osteogenik divisualisasikan dengan pewarnaan 1 mL larutan Alizarin Red 2% (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Uji differensiasi adipogenik memiliki prosedur yang sama, kemudian medium kultur diganti Basal Diferensiasi Adipogenik MesenCult TM (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) ditambah dengan 20% Suplemen Diferensiasi Adipogenik MesenCult TM 5X (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) dan 1% L-Glutamine (Gibco TM Invitrogen, NY, USA). Media dideferensiasi diperbarui setiap 3 hari selama kurang lebih 30 hari, diferensiasi adipogenik

divisualisasikan dengan pewarnaan Oil Red O (Sigma, St. Louis, MO, USA).

4.5.6. Proses Hipoksia

MSCs yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplit hingga 10 mL. MSCs di dalam flask kemudian dimasukkan ke dalam hipoksia *chamber*. Gas N₂ disalurkan melalui katup inlet dan O₂ meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi O₂ di dalam *chamber*. N₂ ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% O₂. *Chamber* yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. MSCs kemudian dipanen dan dipindahkan ke spuit 1 cc dengan media pembawa NaCl 200 µL.

4.5.7. Perlakuan pada Hewan Coba

Tikus ditreatment HMSCs dosis dosis 2.5×10^5 dan 5×10^5 sel dalam 200 µL NaCl secara subkutan pada hari ke 14 setelah induksi UVB. Tikus kemudian diamati secara makroskopis pada hari ke 22 dan didokumentasi. Tikus kemudian dilakukan terminasi setelah pengamatan untuk pemeriksaan parameter uji.

4.5.8. Uji Ekspresi p65

1. Isolasi dan Analisis Konsentrasi dan Kemurnian RNA

Sampel Kulit

Sampel kulit sebanyak 50 mg diambil dari RNA later dipotong 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 ruang 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 3 menit pada suhu ruang dan kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 12000 x g selama 5 menit pada suhu 4°C. Sentrifugasi tersebut memisahkan larutan menjadi 3 layer: 1) *lower red organic phase* (mengandung protein); 2) *interphase* (mengandung DNA); dan 3) *upper aqueous phase* (containing RNA). Lapisan paling atas kemudian 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.

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 2 µL 10x *buffer* for eAMV-RT, 1 µL *enhanced avian* RT, 1 µL *RNAse inhibitor* dan 6 µL *nuclease free water*. Tube berisi sampel dan reagen mix kemudian dimasukkan kembali dalam *thermal cycler* dan diinkubasi dengan suhu 45°C selama 30 menit. Tube sampel kemudian dikeluarkan dan sampel dapat disimpan di suhu -20°C selama 1 bulan untuk proses analisis selanjutnya.

3. Analisis qRT-PCR

Ekspresi mRNA dari gen NF-κβ p65 dianalisis menggunakan qRT-PCR. Master mix untuk qRT-PCR dibuat dengan melarutkan 3 µl sampel cDNA, primer NF-κβ p65 forward (AACACTGCCGAGCTCAAGAT) dan reverse (CATCGGCTTGAGAAAAGGAG) atau primer β-actin forward (5'-GCCTTCCTTCCTGGGTATG-3') dan reverse (5'-AGGAGCCAGGGCAGTAATC-3') masing-masing 1 µL, SYBR Faser master mix universal sebanyak 10 µL dan *nuclease free water* 6 µL. Master mix kemudian dibaca menggunakan illumina eco RT-PCR dengan program amplifikasi 40 siklus yaitu: 1) denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, 2) denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit dan 3) annealing 60°C selama 1 menit. Data peningkatan ekspresi gen dianalisis dalam ratio peningkatan gen target terhadap housekeeping gen

menggunakan software EcoStudy.

4.5.9. Uji Kadar IL-1 β

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 y dan dianalisis kadar IL-1 β 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 1 jam. Sampel kemudian dibuang dan antibody primer kemudian ditambahkan pada masing-masing sampel dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Sampel kemudian dicuci tiga kali menggunakan PBS. HRP *Conjugate* kemudian ditambahkan pada masing-masing sampel kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan ruang gelap. Sampel kemudian dicuci lima kali menggunakan PBS. Reagen substrat kemudian ditambahkan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C pada ruang gelap. *Stop solution* kemudian ditambahkan dan sampel dianalisis menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm (Qiao *et al.* 2020).

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

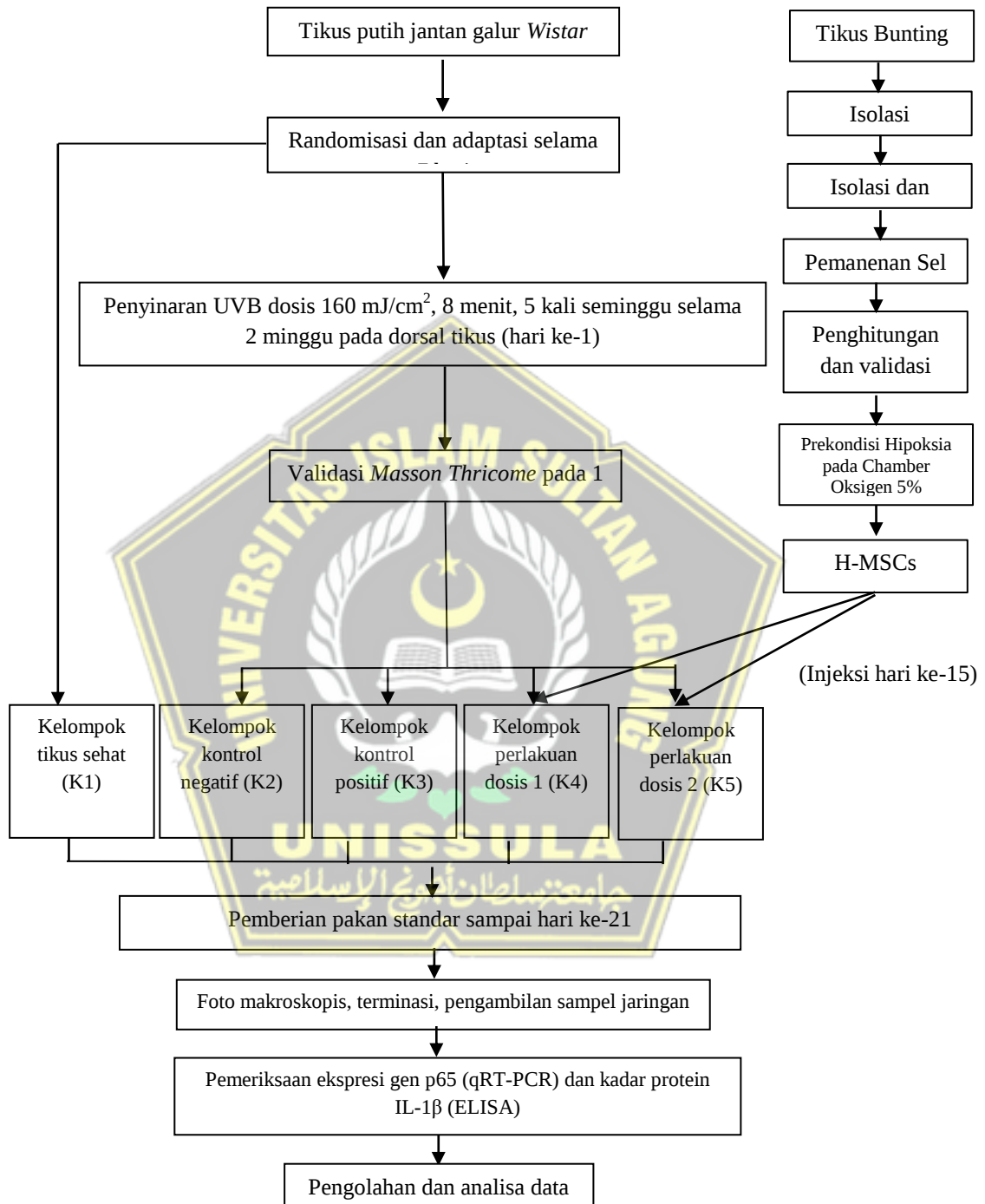
Penelitian ini akan dilakukan di *Integrated Laboratory of SCCR* Indonesia, Semarang pada bulan Oktober hingga November 2024.

4.7. Analisis Data

Hasil kuantifikasi yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan software SPSS v26.0 untuk mengetahui signifikansi antar kelompok penelitian. Analisis normalitas dan variasi data dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Pada penelitian ini didapatkan sebaran dan varian data normal apabila ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), selanjutnya dilakukan uji beda *One Way Anova*. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.

Pada penelitian ini didapatkan sebaran dan varian data normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane*. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

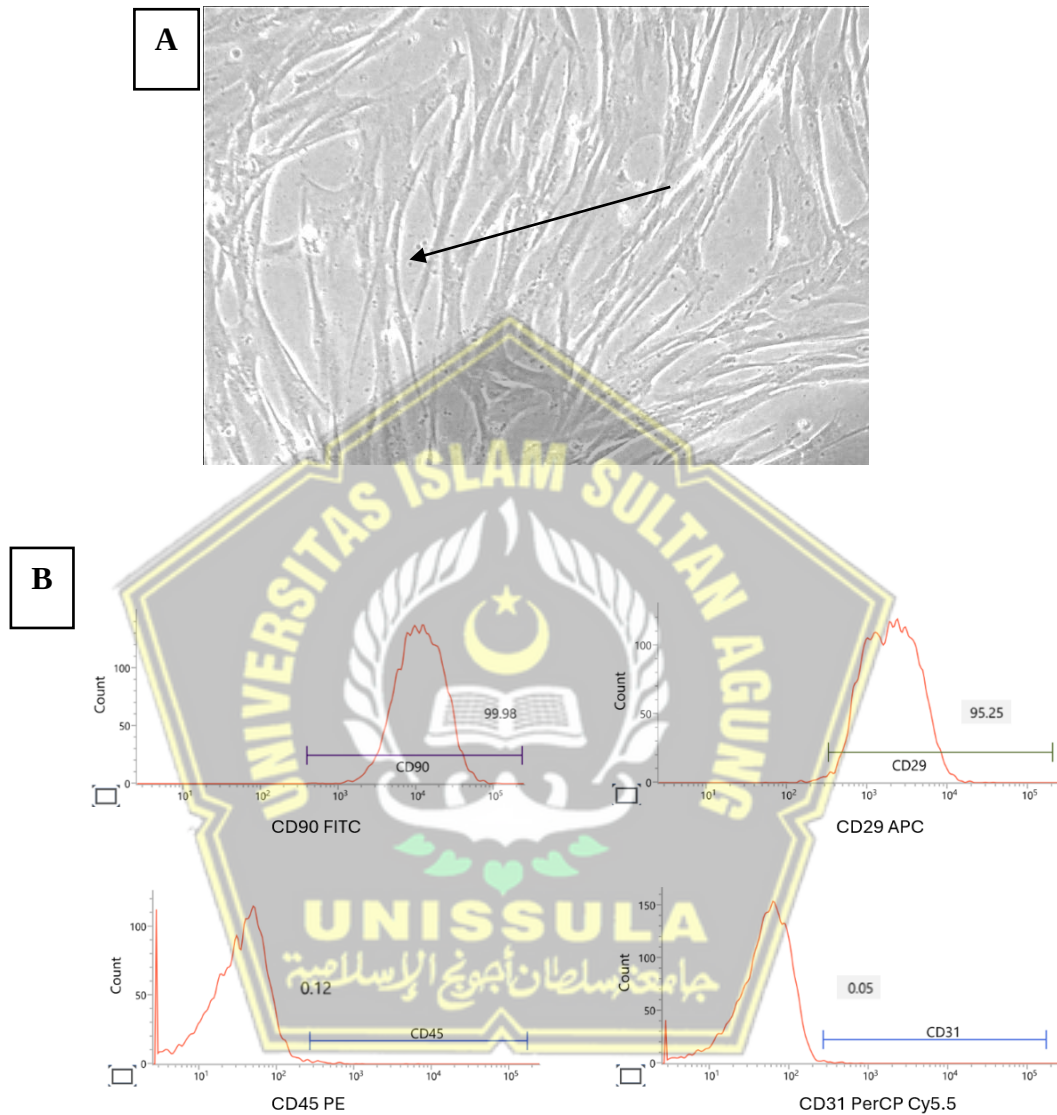
Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Oktober – November 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Semarang. Subjek penelitian adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 200 ± 250 gram dan berusia 2-3 bulan yang diinduksi *collagen loss* menggunakan UVB 302 nm dengan intensitas energi $160 \text{ mJ/cm}^2/\text{hari}$, 5 kali seminggu selama 2 minggu, selama 8 menit/penyinaran pada jarak 20 cm. Menggunakan 25 ekor tikus dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung, terdiri dari 5 kelompok: K1 (tikus sehat tanpa paparan UVB), K2 (tikus yang dipapar UVB diberi injeksi Natrium Chloride 0.9% dengan dosis 200 μL secara subkutan), K3 (tikus yang dipapar UVB mengalami penurunan kolagen dengan perlakuan pemberian *Hyaluronic acid* dosis 200 μL), K4 (tikus yang dipapar UVB diberi injeksi HMSCs dosis 2.5×10^5 sel dalam 200 μL NaCl secara subkutan), dan K5 (Tikus yang dipapar UVB diberi injeksi HMSCs dosis 5×10^5 sel dalam 200 μL NaCl secara subkutan).

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Isolasi Hipoksia *Mesenchymal Stem Cell* (HMSCs)

Isolasi MSCs dilakukan menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask kultur dengan medium khusus. Hasil kultur MSCs setelah pasase ke-7 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask

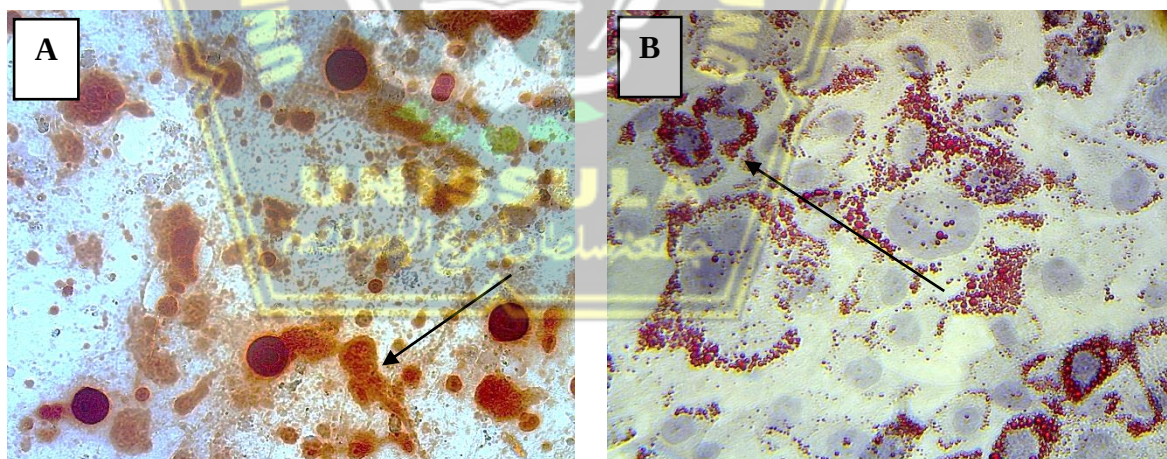
dengan morfologi *spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis seperti pada Gambar 5.1 (A).



Gambar 5.1. (A) Isolasi MSC dengan konfluensi 80% didapatkan gambaran sel berbentuk *spindle-like* (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 40x. (B) Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31.

Marker sel MSCs kemudian divalidasi menggunakan analisis *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam

mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Penelitian ini menunjukkan MSCs mampu mengekspresikan CD90 (99,98%), CD29 (95,25%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (0,12%) dan CD31 (0,05%) terlihat pada Gambar 5.1 (B). Penelitian ini juga menganalisis kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi menjadi berbagai sel matur. MSCs diberi medium khusus agar dapat berdiferensiasi, masing-masing menjadi osteosit dan adiposit. Penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs mampu diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit yang diindikasikan oleh endapan kalsium dan lemak berupa penampakan merah menggunakan metode pewarnaan *Alizarin red* dan *oil red o dye* pada masing-masing kultur osteogenik dan adipogenik (Gambar 5.2 (A dan B)).



Gambar 5. 2. (A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) Adiposit setelah pemberian pewarna *alizarin red* dan *oil red o* pada perbesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam).

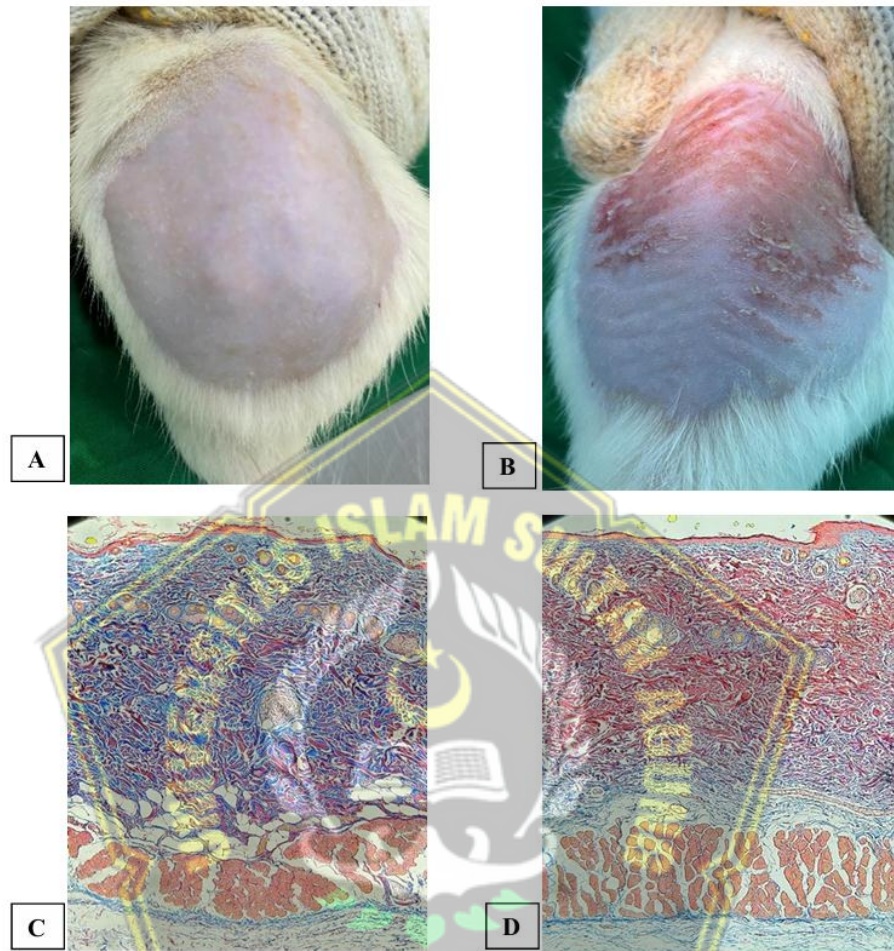
Sel MSCs kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi O_2 5% selama 18 jam menggunakan *chamber* hipoksia.

Penelitian menunjukkan bahwa MSCs yang dikultur dalam kondisi hipoksia memiliki viabilitas yang lebih tinggi dan dapat menghasilkan sitokin dan faktor pertumbuhan, termasuk IL-10 dan TGF- β , yang mendukung proses regenerasi jaringan dan penyembuhan luka. IL-10 merupakan molekul antiinflamasi monomer berukuran ~18kDa yang berfungsi dominan dalam proses imunosupresi dan dapat disekresikan oleh MSCs pada kondisi hipoksia.¹⁰⁹ TGF- β merupakan molekul *growth factor* dimer berukuran 25kDa yang memiliki peran menginduksi kolagen tipe I.¹¹⁰

5.1.2. Validasi Hewan Model yang Diberi Paparan UVB

Model tikus *collagen loss* dibuat melalui penyinaran UVB, tikus diberi paparan sinar UVB 302 nm dari jarak 20 cm dengan intensitas 1 kali MED (160 mJ/cm²/hari) selama 8 menit, dilakukan sebanyak 10 kali dalam kurun waktu 14 hari. Validasi pembentukan model tikus dengan kehilangan kolagen dilakukan secara makroskopis dengan mengamati adanya kerutan pada tikus yang terpapar UVB dibandingkan dengan tikus yang tidak terpapar. Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan bahwa kerutan terlihat lebih jelas pada tikus yang terpapar UVB dibandingkan dengan yang tidak terpapar, seperti ditunjukkan pada Gambar 5.3 (A dan B). Selain itu, validasi juga dilakukan secara mikroskopis menggunakan pengecatan *Masson Trichrome* untuk menilai densitas kolagen pada tikus yang terpapar UVB. Hasil *staining* menunjukkan penurunan densitas kolagen setelah paparan UVB, sebagaimana terlihat pada

Gambar 5.3 (C dan D).



Gambar 5.3. Validasi *Collagen Loss*. Tikus kelompok sehat tidak terlihat adanya kerutan (A), Tikus yang disinari UVB tanpa perlakuan lebih terlihat jelas adanya kerutan (B). *Staining* kolagen dengan *Masson Trichome* ditunjukkan dengan warna biru lebih banyak terlihat di tikus sehat (C), dibandingkan dengan tikus yang terpapar UVB dan tanpa perlakuan (D).

Injeksi HMSCs diberikan satu kali pada hari ke-15, dengan dosis 2.5×10^5 sel dan 5×10^5 sel dalam 200 μ L NaCl secara subkutan. Selanjutnya dilakukan proses pengambilan sampel jaringan pada hari ke-22 (dihitung mulai dari tikus mulai diberikan sinar UVB). Jaringan yang diambil kemudian disimpan dalam tube

berisi *Buffer Netral Formalin* 10% untuk dilakukan ekstraksi RNA kemudian sintesis cDNA dan dilakukan analisis ekspresi p65 dengan metode qRT-PCR. Selain itu, jaringan lain diambil dan disimpan dalam tube yang berisi *Phosphat Buffered Saline* untuk dilakukan ekstraksi protein kemudian dilakukan analisis kadar IL-1 β dengan metode ELISA.

5.1.3. Efek Pemberian injeksi HMSCs terhadap ekspresi p65 pada tikus model *Collagen Loss*

Tabel 5.1 menunjukkan hasil analisis ekspresi p65, ditemukan bahwa kelompok perlakuan injeksi HMSCs dosis 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K5) memiliki ekspresi p65 terendah ($0,73 \pm 0,22$), yang kemudian diikuti oleh kelompok kontrol positif (K3) ($1,08 \pm 0,48$), kelompok perlakuan injeksi HMSCs dosis 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K4) ($1,13 \pm 0,50$), sementara kelompok sehat (K1) memiliki ekspresi p65 ($1,50 \pm 0,36$), selanjutnya kelompok kontrol negatif (K2) memiliki ekspresi p65 tertinggi yaitu ($2,47 \pm 0,49$).

Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Ekspresi p65

Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
Ekspresi relatif p65	1,50	2,47	1,08	1,13	0,73	
SD	0,36	0,49	0,48	0,50	0,22	
Shapiro Wilk (Sig.)	0,167	0,457	0,95	0,120	0,395	>0,05
Lavene test						>0,05
One Way ANOVA						<0,001

Berdasarkan data diatas, terdapat tren penurunan ekspresi p65 pada kelompok K4 dan K5 dibandingkan dengan K2. K5 menunjukkan kemampuan *supresi* p65 yang paling optimal. Pada data deskriptif, ekspresi p65 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok $p > 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik *One-way ANOVA* dan didapatkan hasil $p < 0,001$, artinya terdapat perbedaan signifikan dan dapat dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* LSD yang disajikan dalam tabel 5.2.

Tabel 5.2. Perbedaan Rerata Ekspresi p65 Antar Dua Kelompok dengan Uji *Post-Hoc* LSD

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	<0,001
	K3	0,100
	K4	0,149
	K5	0,004
K2	K3	<0,001
	K4	<0,001
	K5	<0,001
K3	K4	0,830
	K5	0,162
K4	K5	0,110

Hasil uji lanjut *post-hoc* LSD menunjukkan bahwa kelompok K1 jika dibandingkan dengan K2 memiliki nilai signifikansi $p < 0,001$, dibandingkan dengan K3 menghasilkan nilai 0,100 dan K4 menghasilkan nilai 0,149 artinya didapatkan nilai signifikansi

$p > 0,05$, dan K1 dibandingkan dengan K5 menunjukkan nilai $p < 0,05$ (0,004). Selanjutnya kelompok K2 dibandingkan dengan K3, K4, dan K5 menghasilkan nilai signifikansi $p < 0,05$ ($< 0,001$), artinya terdapat beda nyata antar kelompok tersebut. Kelompok K3 dibandingkan dengan K4 dan K5 $p > 0,05$, K4 dibandingkan dengan K5 $p > 0,05$, dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak terdapat beda nyata antar kelompok tersebut.



Gambar 5.4 Grafik Ekspresi p65 dengan menggunakan analisis qRT-PCR, kelompok sehat (tidak terpapar UVB), kelompok kontrol negatif (terpapar UVB dengan injeksi NaCl), kontrol positif (terpapar UVB dengan injeksi *hyaluronic acid*), P1 (terpapar UVB dengan dosis injeksi HMSCs 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L), P2 (terpapar UVB dengan dosis injeksi HMSCs 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L).

Gambar 5.4 menunjukkan bahwa ekspresi p65 mengalami penurunan yang ditemukan pada kedua dosis perlakuan injeksi HMSCs secara subkutan dibandingkan dengan kelompok K2 (kontrol negatif) artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara

kontrol negatif dengan kedua perlakuan dengan nilai signifikansi ($p < 0,001$). Di sisi lain, terdapat perbedaan signifikan antara kelompok K1 (sehat) dengan kelompok K2 (kontrol negatif) yang dapat diartikan bahwa hewan model pada penelitian ini yang digunakan sebagai sampel sudah mengalami penurunan kolagen dengan nilai signifikansi ($p < 0,001$).

5.1.4. Efek Pemberian injeksi HMSCs terhadap kadar IL-1 β pada tikus model *Collagen Loss*

Hasil analisis kadar IL-1 β yang ditunjukkan pada tabel 5.3, ditemukan bahwa kelompok sehat (K1) memiliki kadar IL-1 β terendah ($203,98 \pm 51,76$ pg/ μ L) yang kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan dosis 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K5) ($520,80 \pm 137,82$ pg/ μ L), kelompok perlakuan dosis 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K4) ($633,14 \pm 63,76$ pg/ μ L), kelompok kontrol positif (K3) ($924,52 \pm 176,37$ pg/ μ L), sementara kelompok kontrol negatif (K2) memiliki kadar IL-1 β tertinggi yaitu ($931,94 \pm 205,80$ pg/ μ L). Kadar IL-1 β yang mengalami penurunan ditemukan pada kedua dosis perlakuan injeksi HMSCs secara subkutan dibandingkan dengan kontrol negatif.

Tabel 5.3. Data Hasil Kadar IL-1 β

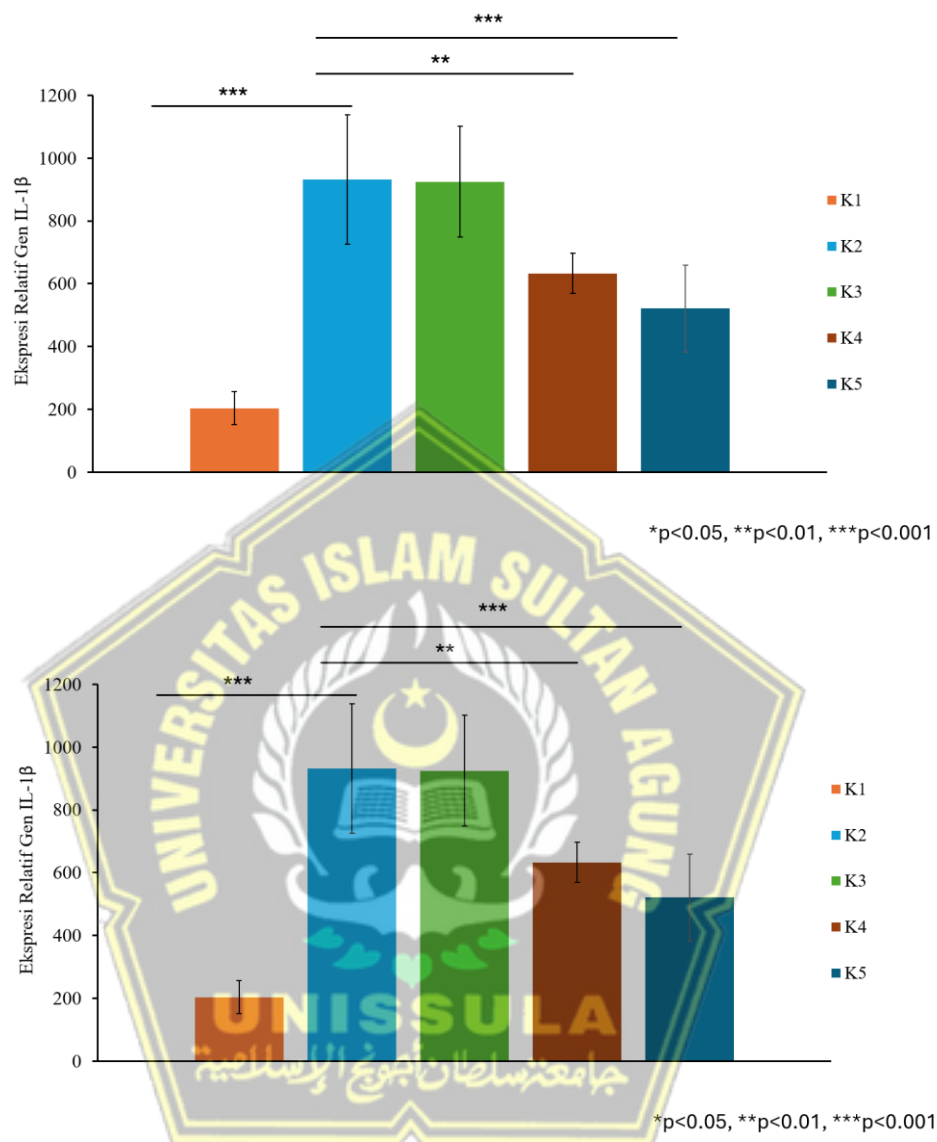
Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
Ekspresi Relatif IL-1 β	203,98	931,94	924,52	633,14	520,80	
Std. deviasi	51,76	205,80	176,37	63,76	137,82	
Shapiro Wilk (Sig.)	0,819	0,972	0,778	0,624	0,926	>0,05
Lavene test						>0,05
One Way ANOVA						<0,001

Data yang dihasilkan dari analisis ELISA kemudian dilakukan analisis sebaran normalitas pada masing-masing kelompok. Hasil analisis sebaran normalitas menunjukkan bahwa sebaran data kadar IL-1 β dalam kelima kelompok tersebut normal yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi $p > 0,05$ (Tabel 5.3). Dilanjutkan dengan uji homogenitas varian data menggunakan *lavene test*, hasil uji menunjukkan bahwa sebaran data homogen karena nilai signifikansi $p > 0,05$. Berdasarkan data yang memiliki karakteristik normal dan homogen, maka untuk menentukan apakah terdapat perbedaan signifikan dalam rata-rata kadar IL-1 β diantara lima kelompok yang dibandingkan, dilakukan analisis statistik menggunakan uji parametric *One Way ANOVA*. Hasil uji menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dalam data kadar IL-1 β diantara kelompok-kelompok tersebut, setidaknya pada dua kelompok. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji *Post-Hoc LSD*, data hasil uji ditampilkan dalam Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Perbedaan Rerata Kadar IL-1 β Antar Dua Kelompok dengan Uji Post-Hoc LSD

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	<0,001
	K3	<0,001
	K4	<0,001
	K5	0,002
K2	K3	0,934
	K4	0,003
	K5	<0,001
K3	K4	0,004
	K5	<0,001
K4	K5	0,222

Hasil uji Post-Hoc LSD data kadar IL-1 β menunjukkan bahwa kelompok kelompok sehat (K1) jika dibandingkan dengan kelompok K2, K3, K4, dan K5 memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$. Kelompok kontrol negatif (K2) jika dibandingkan dengan kelompok K3 tidak terdapat beda nyata ($p > 0,05$), akan tetapi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan injeksi HMSCs kedua dosis menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif jika dibandingkan dengan perlakuan. Begitu pun dengan kelompok kontrol positif (K3) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$, disisi lain tidak terdapat beda nyata antara kelompok perlakuan dosis 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K4) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan dosis 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K5) yang menunjukkan nilai 0,222 ($p > 0,05$).



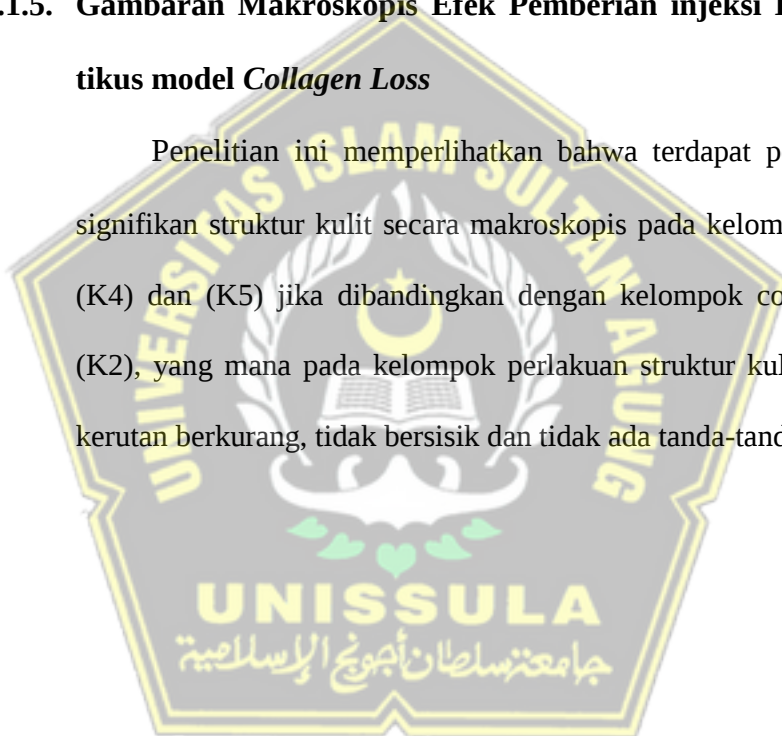
Gambar 5.5 Grafik Kadar IL-1 β dengan menggunakan analisis ELISA, kelompok sehat (tidak terpapar UVB), kelompok kontrol negatif (terpapar UVB dengan injeksi NaCl), kontrol positif (terpapar UVB dengan injeksi *hyaluronic acid*), P1 (terpapar UVB dengan dosis injeksi HMSCs 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L), P2 (terpapar UVB dengan dosis injeksi HMSCs 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L).

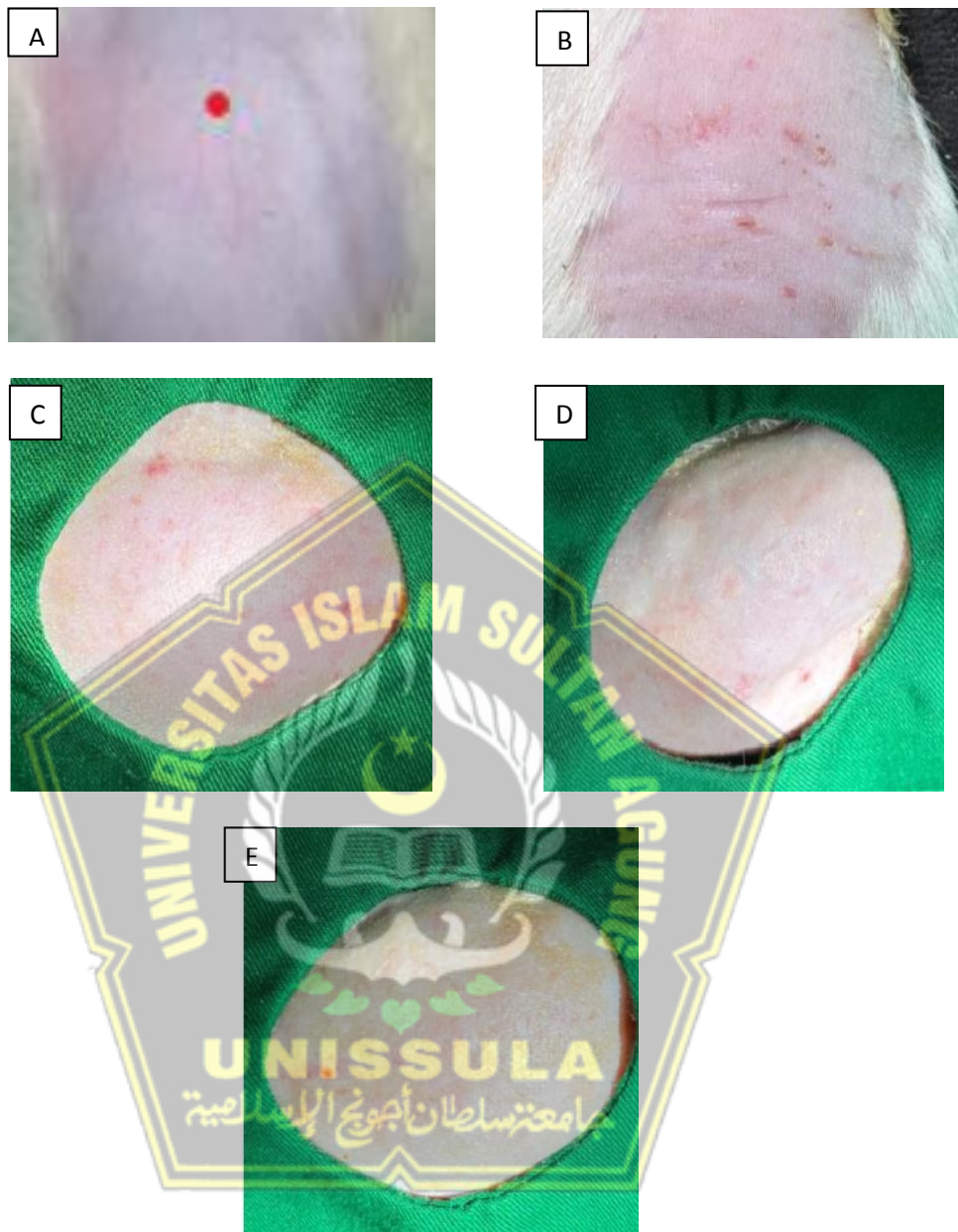
Gambar 5.5 menunjukkan penurunan kadar IL-1 β pada kedua dosis perlakuan injeksi HMSCs secara subkutan dibandingkan dengan kontrol negatif artinya terdapat perbedaan signifikan antara

kelompok kontrol negatif (K2) dengan kedua perlakuan dengan nilai signifikansi K4 ($p < 0,01$) dan K5 ($p < 0,001$). Di sisi lain, terdapat perbedaan signifikan antara kelompok sehat (K1) dengan kelompok kontrol negatif yang dapat diartikan bahwa hewan model penelitian yang digunakan sebagai sampel berhasil atau sudah mengalami *collagen loss* dengan nilai signifikansi ($p < 0,001$).

5.1.5. Gambaran Makroskopis Efek Pemberian injeksi HMSCs pada tikus model *Collagen Loss*

Penelitian ini memperlihatkan bahwa terdapat perbaikan yang signifikan struktur kulit secara makroskopis pada kelompok perlakuan (K4) dan (K5) jika dibandingkan dengan kelompok control negative (K2), yang mana pada kelompok perlakuan struktur kulit lebih halus, kerutan berkurang, tidak bersisik dan tidak ada tanda-tanda kemerahan.





Gambar 5.6 Penampang makroskopis masing-masing kelompok setelah 1 minggu penyuntikan HMSC. (A) Gambaran makroskopis kulit tikus sehat (K1), (B) Gambaran makroskopis kulit tikus kontrol negatif (K2), (C) Gambaran makroskopis kulit tikus kontrol positif (K3), (D) Gambaran makroskopis kulit tikus injeksi HMSCs dosis 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K4), (E) Gambaran makroskopis kulit tikus injeksi HMSCs dosis 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L (K5)

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Radiasi sinar UVB merupakan penyebab utama *fotoaging* yang berdampak pada penurunan kemampuan kulit untuk memproduksi kolagen yang ditandai dengan kondisi inflamasi yang berlebihan.⁷⁴ Respon inflamasi yang diinduksi UVB disebabkan oleh aktivasi jalur pensinyalan NF- κ B terutama p65 di epidermis yang berdampak pada sekresi berbagai sitokin proinflamasi, seperti IL-1 β .¹⁷ Guo *et al.*, (2024) melaporkan bahwa p65 berperan penting dalam *maintance* dan ekspansi proses inflamasi pada kulit. Hal ini mengesankan bahwa penekanan jalur pensinyalan p65 diharapkan dapat menekan respon inflamasi yang diinduksi radiasi sinar UVB. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian injeksi HMSCs secara subkutan terhadap ekspresi p65 dan kadar IL-1 β pada tikus model *collagen loss*. Analisis kemampuan anti-inflamasi HMSCs dilakukan menggunakan model *fotoaging* kulit tikus jantan galur wistar karena merupakan mamalia dengan struktur kulit yang mirip dengan manusia. Tikus diinduksi menggunakan paparan sinar UVB dengan panjang gelombang 302 nm dan intensitas energi 1 kali MED (160 mJ/cm²/hari) selama 8 menit, dilakukan sebanyak 10 kali dalam kurun waktu 14 hari.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat penurunan ekspresi p65 dan kadar IL-1 β secara signifikan pada semua kelompok perlakuan dibanding kontrol negatif, dimana penurunan optimum terjadi pada injeksi HMSCs dengan dosis 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L. Hal ini diduga dapat terjadi karena kandungan sitokin IL-10 pada HMSCs yang mampu berperan dalam penekanan proses inflamasi pada *collagen loss*, sehingga

menurunkan ekspresi p65 dan kadar IL-1 β . Ramadhanti et al., (2021) menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi IL-10 pada luka eksisi yang diberikan injeksi HMSC 5% secara subkutan dibandingkan dengan Normoxic. Hal ini menjadi bukti pendukung bahwa HMSC mampu meningkatkan sekresi IL-10. Nagata et al., (2021) dalam penelitiannya melaporkan bahwa IL-10 mampu berperan dalam penekanan inflamasi melalui aktivasi beberapa protein intraseluler, salah satunya adalah *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). IL-10 akan berikatan pada receptor dan mengaktivasi jalur pensinyalan *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT-3). Protein STAT3 akan masuk ke nukleus dan mengaktivasi sekuens mRNA SOCS3. Protein SOCS3 kemudian diekspresikan secara intraseluler dan menekan berbagai jalur pensinyalan proinflamasi, salah satunya adalah p65. Penekanan jalur p65 akan berujung pada penurunan sekresi berbagai sitokin proinflamasi, seperti IL-1 β . Hasil ini sejalan dengan penelitian Mayasari et al., (2023) yang mengkonfirmasi bahwa sekresi MSCs memiliki beberapa molekul bioaktif yang mampu menghambat ekspresi dari molekul pro-inflamasi melalui jalur NF-k β , pada kasus hiperpigmentasi akibat paparan UVB.

Mesenchymal stem cells (MSCs) memiliki potensi besar untuk menyembuhkan berbagai jenis inflamasi dan regenerasi jaringan. Prekondisi hipoksia (MSCs dikultur dalam kondisi rendah oksigen) adalah pendekatan yang menjanjikan. Penelitian menunjukkan bahwa MSC yang mengalami prekondisi hipoksia (HMSCs) dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-

inflamasi dan faktor pertumbuhan, membantu mengontrol proses inflamasi, dan mempercepat penyembuhan luka. HMSCs diketahui meningkatkan produksi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10.¹¹¹ IL-10 berperan penting dalam menghambat respon imun yang berlebihan dan mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi, seperti IL-1 β dan TNF- α .¹¹² Dengan menurunkan kadar sitokin pro-inflamasi, HMSCs membantu mengurangi inflamasi dalam jaringan. HMSCs dapat memodulasi aktivasi jalur p65, yang merupakan jalur kunci dalam respon inflamasi.³⁹ Aktivasi p65 berhubungan dengan peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi. Dengan mengatur aktivasi jalur ini, HMSCs dapat menurunkan ekspresi p65 dan mengurangi produksi IL-1 β serta sitokin inflamasi lainnya.¹¹³ HMSCs tidak hanya berperan dalam menurunkan inflamasi tetapi juga meningkatkan sintesis kolagen melalui sekresi faktor pertumbuhan seperti TGF- β .¹¹¹

Secara keseluruhan, hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pre-kondisi hipoksia pada MSCs (HMSCs) yang diinjeksikan secara subkutan terutama pada dosis yang paling optimal yaitu 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L, memiliki aktivitas anti-inflamasi pada tikus model *collagen loss* melalui penekanan ekspresi p65 dan kadar IL-1 β . Hal ini mengesankan bahwa HMSCs memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai terapi yang tertarget dalam penekanan proses inflamasi, terutama pada permasalahan terjadinya penurunan kemampuan sintesis kolagen pada kulit (*collagen loss*).

5.3. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak mengeksplorasi efek pemberian injeksi HMSCs secara subkutan terhadap kadar ROS, ekspresi protein intraseluler, dan ekspresi gen IL-10, serta ekspresi protein SOCS3 dan STAT3 pada tikus model *collagen loss*. Selain itu, penelitian ini kedepannya akan lebih baik apabila ada tambahan data terkait dengan pengukuran pada beberapa variasi waktu pengamatan difase inflamasi, proliferasi, dan *remodeling* setelah dilakukan pemberian injeksi HMSCs secara subkutan pada tikus model *collagen loss*.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian tentang pengaruh injeksi HMSCs secara subkutan terhadap ekspresi p65 dan kadar IL-1 β pada tikus jantan galur wistar dengan model *collagen loss* akibat irradiasi UVB adalah sebagai berikut:

1. HMSCs yang diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang di papar sinar UVB dengan dosis 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L dan 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L dapat menurunkan ekspresi p65 dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. HMSCs yang diinjeksikan secara subkutan pada tikus model *collagen loss* yang di papar sinar UVB dengan dosis 2.5×10^5 dalam NaCl 200 μ L dan 5×10^5 dalam NaCl 200 μ L dapat menurunkan kadar IL-1 β dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

Penelitian ini bisa dilanjutkan dengan metode yang sama, tetapi dengan memperhatikan pengukuran kadar ROS, ekspresi protein intraseluler, dan ekspresi gen IL-10, ekspresi protein SOCS3 dan STAT3 setelah dilakukan pemberian injeksi HMSCs secara subkutan pada tikus model *collagen loss*. Di sisi lain, perlu dilakukan pengukuran pada beberapa variasi waktu pengamatan difase inflamasi, proliferasi, dan remodeling

setelah dilakukan pemberian injeksi HMSCs secara subkutan pada tikus model *collagen loss*.



DAFTAR PUSTAKA

1. Cheng L, Liu J, Wang Q, Hu H, Zhou L. The Protective Effect of a Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Supernatant on UVB-Induced Skin Photodamage. *Cells*. 2024 Jan 15;13(2):156. doi: 10.3390/cells13020156. PMID: 38247847; PMCID: PMC10814745.
2. Moon JM, Park SH, Jhee KH, Yang SA. Protection against UVB-Induced Wrinkle Formation in SKH-1 Hairless Mice: Efficacy of Tricin Isolated from Enzyme-Treated *Zizania latifolia* Extract. *Molecules*. 2018 Sep 4;23(9):2254. doi: 10.3390/molecules23092254. PMID: 30181503; PMCID: PMC6225172.
3. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 1;20(7):1126-67. doi: 10.1089/ars.2012.5149. Epub 2013 Oct 22. PMID: 23991888; PMCID: PMC3929010.
4. Meier-Soelch J, Mayr-Buro C, Juli J, Leib L, Linne U, Dreute J, Papantonis A, Schmitz ML, Kracht M. Monitoring the Levels of Cellular NF- κ B Activation States. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 26;13(21):5351. doi: 10.3390/cancers13215351. PMID: 34771516; PMCID: PMC8582385.
5. Su VY, Lin CS, Hung SC, Yang KY. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Induces Neutrophil Apoptosis Associated with Inhibition of the NF- κ B Pathway in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci*. 2019 May 5;20(9):2208. doi: 10.3390/ijms20092208. PMID: 31060326; PMCID: PMC6540353.
6. Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation, migration and disease susceptibility. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Mar 19;367(1590):785-92. doi: 10.1098/rstb.2011.0308. PMID: 22312045; PMCID: PMC3267121.
7. Gromkowska-Kępa KJ, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, Socha K. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging - review of in vitro studies. *J Cosmet Dermatol*. 2021 Nov;20(11):3427-3431. doi: 10.1111/jocd.14033. Epub 2021 Mar 13. PMID: 33655657; PMCID: PMC8597149.
8. Chircov C, Grumezescu AM, Bejenaru LE. Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(1):71-76. PMID: 29940614.

9. Nejati, S., Mongeau, L. Injectable, pore-forming, self-healing, and adhesive hyaluronan hydrogels for soft tissue engineering applications. *Sci Rep* 13, 14303 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41468-9>.
10. Nguyen Trong, H. et al. The efficacy and safety of hyaluronic acid microinjection for skin rejuvenation in Vietnam. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* (2019) doi:10.3889/oamjms.2019.059.
11. Kustyah, A. R., Fatimah, N., Rizkiyani, E. M., Ramadhanti, O. W., Istiqomah, D. A. F., Hidayah, N., & Bhirau Wilaksono. (2022). Hypoxia Precondition Enhance the Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells via regulating TGF- β 1 and IL-10 serial expression in Skin Excision Rat Models. *International Journal of Cell and Biomedical Science*, 1(1), 2-9. <https://doi.org/10.59278/cbs.v1i1.9>.
12. Liu J, He J, Huang Y, Ge L, Xiao H, Zeng L, Jiang Z, Lu M, Hu Z. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate microglial pyroptosis after intracerebral hemorrhage. *Ann Transl Med.* 2021 Sep;9(17):1362. doi: 10.21037/atm-21-2590. PMID: 34733914; PMCID: PMC8506532.
13. Liu YY, Chiang CH, Hung SC, Chian CF, Tsai CL, Chen WC, Zhang H. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells ameliorate ischemia/reperfusion-induced lung injury. *PLoS One.* 2017 Nov 8;12(11):e0187637. doi: 10.1371/journal.pone.0187637. PMID: 29117205; PMCID: PMC5678873.
14. Ebrahimi, N., Abdulwahid, AH.R.R., Mansouri, A. et al. Targeting the NF- κ B pathway as a potential regulator of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 81, 106 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00018-023-05098-8>.
15. Tu J, Fang Y, Han D, et al. Activation of nuclear factor- κ B in the angiogenesis of glioma: Insights into the associated molecular mechanisms and targeted therapies. *Cell Prolif.* 2021;54:e12929. <https://doi.org/10.1111/cpr.12929>.
16. Yang L, Cao J, Du Y, Zhang X, Hong W, Peng B, Wu J, Weng Q, Wang J, Gao J. Initial IL-10 production dominates the therapy of mesenchymal stem cell scaffold in spinal cord injury. *Theranostics* 2024; 14(2):879-891. doi:10.7150/thno.87843. <https://www.thno.org/v14p0879.htm>.
17. Guo W, Imai S, Yang J-L, Zou S, Li H, Xu H, Moudgil KD, Dubner R, Wei F and Ren K (2018) NF-KappaB Pathway Is Involved in Bone Marrow Stromal Cell-Produced Pain Relief. *Front. Integr. Neurosci.* 12:49. doi: 10.3389/fnint.2018.00049.

18. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023 (2017). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
19. Ma J, Zhang Y, Sugai T, Kubota T, Keino H, El-Salhy M, Ozaki M, Umezawa K. Inhibition of Cellular and Animal Inflammatory Disease Models by NF- κ B Inhibitor DHMEQ. *Cells*. 2021 Sep 1;10(9):2271. doi: 10.3390/cells10092271. PMID: 34571920; PMCID: PMC8466912.
20. Prescott JA, Mitchell JP, Cook SJ. Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease. *Biochem J*. 2021 Jul 16;478(13):2619-2664. doi: 10.1042/BCJ20210139. PMID: 34269817; PMCID: PMC8286839.
21. Pu CM, Liu CW, Liang CJ, Yen YH, Chen SH, Jiang-Shieh YF, Chien CL, Chen YC, Chen YL. Adipose-Derived Stem Cells Protect Skin Flaps against Ischemia/Reperfusion Injury via IL-6 Expression. *J Invest Dermatol*. 2017 Jun;137(6):1353-1362. doi: 10.1016/j.jid.2016.12.030. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28163069.
22. Sun T, Zhou C, Lu F, Dong Z, Gao J, Li B. Adipose-derived stem cells in immune-related skin disease: a review of current research and underlying mechanisms. *Stem Cell Res Ther*. 2024 Feb 8;15(1):37. doi: 10.1186/s13287-023-03561-8. PMID: 38331803; PMCID: PMC10854049.
23. Yang Y, Lee EH, Yang Z. Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022;28(5):966-977. doi:10.1089/ten.teb.2021.0145
24. Mayasari YI, Subchan P, Putra A, Chodijah C, Hussana A, Sumarawati T, Amalina ND, Irawan RCS. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells Inhibited Ultraviolet Radiation by Inhibiting Interleukin-6 through Nuclear Factor-Kappa Beta Pathway in Hyperpigmentation Animal Models. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 2023 Jan. 19 [cited 2024 Jul. 19];11(B):188-94. Available from: <https://oamjms.eu/index.php/mjms/article/view/11222>.
25. Yang Y, Wu Y, Yang D, et al. Secretive derived from hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration and mitigate joint inflammation via extracellular vesicles. *Bioact Mater*. 2023;27:98-112. doi:10.1016/j.bioactmat.2023.03.017
26. Kou Z, Li B, Aierken A, Tan N, Li C, Han M, Jing Y, Li N, Zhang S, Peng S, Zhao X, Hua J. Mesenchymal Stem Cells Pretreated with Collagen Promote Skin Wound-Healing. *Int J Mol Sci*. 2023 May 12;24(10):8688. doi: 10.3390/ijms24108688. PMID: 37240027; PMCID: PMC10218687.

27. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018 Jan;281(1):8-27. doi: 10.1111/imr.12621. PMID: 29247995; PMCID: PMC5756628.
28. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 28;20(23):6008. doi: 10.3390/ijms20236008. PMID: 31795299; PMCID: PMC6929211.
29. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev.* 2009 Apr;60(1):57-64. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.020. Epub 2008 Dec 31. PMID: 19166877; PMCID: PMC3076185.
30. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017 Dec 14;9(6):7204-7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208. PMID: 29467962; PMCID: PMC5805548.
31. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Aug;22(4):189-95. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001. Epub 2011 Oct 22. PMID: 22019906; PMCID: PMC3714593.
32. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 12;22(8):3974. doi: 10.3390/ijms22083974. PMID: 33921444; PMCID: PMC8069861.
33. Mestrallet G, Rouas-Freiss N, LeMaout J, Fortunel NO, Martin MT. Skin Immunity and Tolerance: Focus on Epidermal Keratinocytes Expressing HLA-G. *Front Immunol.* 2021 Dec 6;12:772516. doi: 10.3389/fimmu.2021.772516. PMID: 34938293; PMCID: PMC8685247.
34. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 20;21(24):9739. doi: 10.3390/ijms21249739. PMID: 33419373; PMCID: PMC7767220.
35. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(sup1):177-183. doi: 10.3109/14756366.2016.1161620. Epub 2016 Mar 30. PMID: 27028474.

36. Ciążyńska M, Olejniczak-Staruch I, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. Ultraviolet Radiation and Chronic Inflammation-Molecules and Mechanisms Involved in Skin Carcinogenesis: A Narrative Review. *Life (Basel)*. 2021 Apr 8;11(4):326. doi: 10.3390/life11040326. PMID: 33917793; PMCID: PMC8068112.
37. de Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. *Adv Exp Med Biol*. 2017;996:15-23. doi: 10.1007/978-3-319-56017-5_2. PMID: 29124687.
38. Yue Z, Nie L, Zhao P, Ji N, Liao G, Wang Q. Senescence-associated secretory phenotype and its impact on oral immune homeostasis. *Front Immunol*. 2022 Oct 4;13:1019313. doi: 10.3389/fimmu.2022.1019313. PMID: 36275775; PMCID: PMC9581398.
39. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res*. 2018 Oct 30;11:407-419. doi: 10.2147/JIR.S140188. PMID: 30464573; PMCID: PMC6217131.
40. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct;1(4):a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034. PMID: 20066092; PMCID: PMC2773619.
41. Singh S, Singh TG. Role of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Signalling in Neurodegenerative Diseases: An Mechanistic Approach. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(10):918-935. doi: 10.2174/1570159X18666200207120949. PMID: 32031074; PMCID: PMC7709146.
42. Leiba J, Özbilgiç R, Hernández L, Demou M, Lutfalla G, Yatime L, Nguyen-Chi M. Molecular Actors of Inflammation and Their Signaling Pathways: Mechanistic Insights from Zebrafish. *Biology (Basel)*. 2023 Jan 19;12(2):153. doi: 10.3390/biology12020153. PMID: 36829432; PMCID: PMC9952950.
43. Wu KI, Schmid-Schönbein GW. Nuclear factor kappa B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 2011 Feb;57(2):261-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158709. Epub 2011 Jan 10. PMID: 21220710; PMCID: PMC3077933.
44. Wan J, Zhang G, Li X, Qiu X, Ouyang J, Dai J, Min S. Matrix Metalloproteinase 3: A Promoting and Destabilizing Factor in the Pathogenesis of Disease and Cell Differentiation. *Front Physiol*. 2021 Jul 2;12:663978. doi: 10.3389/fphys.2021.663978. PMID: 34276395; PMCID: PMC8283010.

45. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651. Epub 2009 Oct 7. PMID: 20457564; PMCID: PMC2882124.
46. Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang RF. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol.* 2022 Mar 3;13:812774. doi: 10.3389/fimmu.2022.812774. PMID: 35309296; PMCID: PMC8927970.
47. Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, Muehleisen B, Muto J, Borkowski AW, Martinez L, Greidinger EL, Yu BD, Gallo RL. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med.* 2012 Aug;18(8):1286-90. doi: 10.1038/nm.2861. Epub 2012 Jul 8. PMID: 22772463; PMCID: PMC3812946.
48. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 2014 Jun;26(3):253-66. doi: 10.1016/j.smim.2014.05.004. Epub 2014 Jun 21. PMID: 24958609; PMCID: PMC4156877.
49. Kim, M., Shibata, T., Kwon, S. et al. Ultraviolet-irradiated endothelial cells secrete stem cell factor and induce epidermal pigmentation. *Sci Rep* 8, 4235 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22608-y>.
50. Blanpain, C., Fuchs, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 207–217 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrm2636>.
51. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 8;22(5):2719. doi: 10.3390/ijms22052719. PMID: 33800290; PMCID: PMC7962638.
52. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Feb;12(2):126-31. doi: 10.1038/nrm3049. PMID: 21253000; PMCID: PMC3346289.
53. Kou, M., Huang, L., Yang, J. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool?. *Cell Death Dis* 13, 580 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05034-x>.
54. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol Sci.* 2020 Sep;41(9):653-664. doi: 10.1016/j.tips.2020.06.009. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32709406; PMCID: PMC7751844.

55. Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJ. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int.* 2015;2015:831095. doi: 10.1155/2015/831095. Epub 2015 May 27. PMID: 26106431; PMCID: PMC4461792.
56. Dörnen J, Dittmar T. The Role of MSCs and Cell Fusion in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 12;22(20):10980. doi: 10.3390/ijms222010980. PMID: 34681639; PMCID: PMC8535885.
57. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med.* 2010 Jan;5(1):121-43. doi: 10.2217/rme.09.74. PMID: 20017699; PMCID: PMC2833273.
58. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008 Nov 21;103(11):1204-19. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176826. PMID: 19028920; PMCID: PMC2667788.
59. Li X, Jiang O, Wang S. Molecular mechanisms of cellular metabolic homeostasis in stem cells. *Int J Oral Sci.* 2023 Dec 1;15(1):52. doi: 10.1038/s41368-023-00262-z. PMID: 38040705; PMCID: PMC10692173.
60. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(4):215-30. PMID: 17219716.
61. Rustad KC, Gurtner GC. Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012 Aug;1(4):147-152. doi: 10.1089/wound.2011.0314. PMID: 24527296; PMCID: PMC3623614.
62. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells.* 2016 Mar 26;8(3):73-87. doi: 10.4252/wjsc.v8.i3.73. PMID: 27022438; PMCID: PMC4807311.
63. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11):2739-49. doi: 10.1634/stemcells.2007-0197. Epub 2007 Jul 26. PMID: 17656645.
64. Li Z, Hu X, Zhong JF. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application. *Stem Cells Int.* 2019 Mar 6;2019:8106818. doi: 10.1155/2019/8106818. PMID: 30956675; PMCID: PMC6431372.

65. Pérez-Gutiérrez L, Ferrara N. Biology and therapeutic targeting of vascular endothelial growth factor A. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023 Nov;24(11):816-834. doi: 10.1038/s41580-023-00631-w. Epub 2023 Jul 25. PMID: 37491579.
66. Chang C, Yan J, Yao Z, Zhang C, Li X, Mao HQ. Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Paracrine Signals and Their Delivery Strategies. *Adv Healthc Mater.* 2021 Apr;10(7):e2001689. doi: 10.1002/adhm.202001689. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33433956; PMCID: PMC7995150.
67. Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Asadi Rad A, Assadzadeh-Aghdai H, Sharifian A, Zali MR. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017 Summer;10(3):208-213. PMID: 29118937; PMCID: PMC5660271.
68. Goonoo N, Bhaw-Luximon A. Mimicking growth factors: role of small molecule scaffold additives in promoting tissue regeneration and repair. *RSC Adv.* 2019 Jun 10;9(32):18124-18146. doi: 10.1039/c9ra02765c. PMID: 35702423; PMCID: PMC9115879.
69. Bagno LL, Salerno AG, Balkan W, Hare JM. Mechanism of Action of Mesenchymal Stem Cells (MSCs): impact of delivery method. *Expert Opin Biol Ther.* 2022 Apr;22(4):449-463. doi: 10.1080/14712598.2022.2016695. Epub 2021 Dec 27. PMID: 34882517; PMCID: PMC8934282.
70. Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *ScientificWorldJournal.* 2013 Aug 27;2013:632972. doi: 10.1155/2013/632972. PMID: 24068884; PMCID: PMC3771429.
71. Bajgar R, Moukova A, Chalupnikova N, Kolarova H. Differences in the Effects of Broad-Band UVA and Narrow-Band UVB on Epidermal Keratinocytes. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Nov 26;18(23):12480. doi: 10.3390/ijerph182312480. PMID: 34886205; PMCID: PMC8656598.
72. Amaro-Ortiz A, Yan B, D'Orazio JA. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules.* 2014 May 15;19(5):6202-19. doi: 10.3390/molecules19056202. PMID: 24838074; PMCID: PMC4344124.
73. Shu P, Li M, Zhao N, Wang Y, Zhang L, Du Z. Efficacy and mechanism of retinyl palmitate against UVB-induced skin photoaging. *Front Pharmacol.* 2023 Oct 20;14:1278838. doi: 10.3389/fphar.2023.1278838. PMID: 37927602; PMCID: PMC10622759.

74. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflamm Res*. 2022 Aug;71(7-8):817-831. doi: 10.1007/s00011-022-01598-8. Epub 2022 Jun 24. PMID: 35748903; PMCID: PMC9307547.
75. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol*. 2013 Sep 12;2013:930164. doi: 10.1155/2013/930164. PMID: 24159392; PMCID: PMC3789494.
76. Lee H, Hong Y, Kim M. Structural and Functional Changes and Possible Molecular Mechanisms in Aged Skin. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 19;22(22):12489. doi: 10.3390/ijms222212489. PMID: 34830368; PMCID: PMC8624050.
77. Slominski AT, Zmijewski MA, Plonka PM, Szaflarski JP, Paus R. How UV Light Touches the Brain and Endocrine System Through Skin, and Why. *Endocrinology*. 2018 May 1;159(5):1992-2007. doi: 10.1210/en.2017-03230. PMID: 29546369; PMCID: PMC5905393.
78. Sharma AN, Patel BC. Laser Fitzpatrick Skin Type Recommendations. [Updated 2023 Mar 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557626/>.
79. Solano F. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. *Molecules*. 2020 Mar 27;25(7):1537. doi: 10.3390/molecules25071537. PMID: 32230973; PMCID: PMC7180973.
80. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*. 2008 May-Jun;84(3):539-49. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x. PMID: 18435612; PMCID: PMC2671032.
81. Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng*. 2014 Dec 20;5:2041731414557112. doi: 10.1177/2041731414557112. PMID: 25610589; PMCID: PMC4883592.
82. Kirkness MW, Lehmann K, Forde NR. Mechanics and structural stability of the collagen triple helix. *Mech Biol • Chem Biophys*. 2019;53:98-105. doi:10.1016/j.cbpa.2019.08.001
83. Ramshaw JA, Shah NK, Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol*. 1998;122(1-2):86-91. doi: 10.1006/jsbi.1998.3977. PMID: 9724608.

84. 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. *Biomedicines*. 2022 Sep 16;10(9):2307. doi: 10.3390/biomedicines10092307. PMID: 36140407; PMCID: PMC9496548.
85. Naomi R, Ridzuan PM, Bahari H. Current Insights into Collagen Type I. *Polymers (Basel)*. 2021 Aug 9;13(16):2642. doi: 10.3390/polym13162642. PMID: 34451183; PMCID: PMC8399689.
86. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering (Basel)*. 2021 May 11;8(5):63. doi: 10.3390/bioengineering8050063. PMID: 34064689; PMCID: PMC8151502.
87. Wu Z, Korntner SH, Mullen AM, Zeugolis DI. Collagen type II: From biosynthesis to advanced biomaterials for cartilage engineering. *Biomater Biosyst*. 2021 Nov 22;4:100030. doi: 10.1016/j.bbiosy.2021.100030. PMID: 36824570; PMCID: PMC9934443.
88. Singh D, Rai V, Agrawal DK. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol Cardiovasc Med*. 2023;7(1):5-16. doi: 10.26502/fccm.92920302. Epub 2023 Jan 20. PMID: 36776717; PMCID: PMC9912297.
89. Chung HJ, Uitto J. Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin*. 2010 Jan;28(1):93-105. doi: 10.1016/j.det.2009.10.011. PMID: 19945621; PMCID: PMC2791403.
90. Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, Park KC. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 29;20(9):2126. doi: 10.3390/ijms20092126. PMID: 31036793; PMCID: PMC6540032.
91. Pu SY, Huang YL, Pu CM, Kang YN, Hoang KD, Chen KH, Chen C. Effects of Oral Collagen for Skin Anti-Aging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2023 Apr 26;15(9):2080. doi: 10.3390/nu15092080. PMID: 37432180; PMCID: PMC10180699.
92. Yamaba H, Haba M, Kunita M, Sakaida T, Tanaka H, Yashiro Y, Nakata S. Morphological change of skin fibroblasts induced by UV Irradiation is involved in photoaging. *Exp Dermatol*. 2016 Aug;25 Suppl 3:45-51. doi: 10.1111/exd.13084. PMID: 27539902.

93. Varani J, Spearman D, Perone P, Fligiel SE, Datta SC, Wang ZQ, Shao Y, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol.* 2001 Mar;158(3):931-42. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64040-0. PMID: 11238041; PMCID: PMC1850364.
94. Wang Y, Su HN, Cao HY, Liu SM, Liu SC, Zhang X, Wang P, Li CY, Zhang YZ, Zhang XY, Chen XL. Mechanistic Insight into the Fragmentation of Type I Collagen Fibers into Peptides and Amino Acids by a *Vibrio* Collagenase. *Appl Environ Microbiol.* 2022 Apr 12;88(7):e0167721. doi: 10.1128/aem.01677-21. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35285716; PMCID: PMC9004396.
95. Amansyah F, Budu B, Achmad MH, Daud NMAS, Putra A, Massi MN, Bukhari A, Hardjo M, Parewangi L, Patellongi I. Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Promotes Liver Regeneration and Anti-Fibrotic Effect in Liver Fibrosis Animal Model. *Pak J Biol Sci.* 2024 Jan;27(1):18-26. doi: 10.3923/pjbs.2024.18.26. PMID: 38413394.
96. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Oct-Dec;1799(10-12):775-87. doi: 10.1016/j.bbagr.2010.05.004. Epub 2010 May 21. PMID: 20493977; PMCID: PMC2955987.
97. Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, Tian Y, Liu L, Su M, Wang H, Cao D, Liao Q. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther.* 2018 Apr 11;11:2063-2073. doi: 10.2147/OTT.S161109. PMID: 29695914; PMCID: PMC5905465.
98. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):103-15. doi: 10.1038/cr.2010.178. Epub 2010 Dec 28. PMID: 21187859; PMCID: PMC3193400.
99. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, Goletti D, Sansone C, Calabrone L, Albini A. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol.* 2023 Jun 8;14:1161067. doi: 10.3389/fimmu.2023.1161067. PMID: 37359549; PMCID: PMC10287165.
100. Carow B, Rottenberg ME. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Front Immunol.* 2014 Feb 19;5:58. doi: 10.3389/fimmu.2014.00058. PMID: 24600449; PMCID: PMC3928676.

101. Tie Y, Tang F, Peng D, Zhang Y, Shi H. TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. *Mol Biomed.* 2022 Dec 19;3(1):45. doi: 10.1186/s43556-022-00109-9. PMID: 36534225; PMCID: PMC9761655.
102. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 2018;122(6):877-902. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311401
103. Haneef K, Salim A, Hashim Z, Ilyas A, Syed B, Ahmed A, Zarina S. Chemical Hypoxic Preconditioning Improves Survival and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. *Appl Biochem Biotechnol.* 2024 Jul;196(7):3719-3730. doi: 10.1007/s12010-023-04743-z. Epub 2023 Sep 27. PMID: 37755639.
104. Malkov MI, Lee CT, Taylor CT. Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) by Pro-Inflammatory Cytokines. *Cells.* 2021 Sep 7;10(9):2340. doi: 10.3390/cells10092340. PMID: 34571989; PMCID: PMC8466990.
105. Tavassolifar MJ, Vodjgani M, Salehi Z, Izad M. The Influence of Reactive Oxygen Species in the Immune System and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis.* 2020 Jun 25;2020:5793817. doi: 10.1155/2020/5793817. PMID: 32789026; PMCID: PMC7334772.
106. Gauthier T, Chen W. IFN- γ and TGF- β , Crucial Players in Immune Responses: A Tribute to Howard Young. *J Interferon Cytokine Res.* 2022 Dec;42(12):643-654. doi: 10.1089/jir.2022.0132. PMID: 36516375; PMCID: PMC9917322.
107. Yang Y, Wu Y, Yang D, Neo SH, Kadir ND, Goh D, Tan JX, Denslin V, Lee EH, Yang Z. Secretive derived from hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration and mitigate joint inflammation via extracellular vesicles. *Bioact Mater.* 2023 Mar 29;27:98-112. doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.03.017. PMID: 37006826; PMCID: PMC10063382.
108. Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Hong JS, Gao HM. Through Reducing ROS Production, IL-10 Suppresses Caspase-1-Dependent IL-1 β Maturation, thereby Preventing Chronic Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 11;21(2):465. doi: 10.3390/ijms21020465. PMID: 31940754; PMCID: PMC7013455.
109. York AG, Skadow MH, Oh J, et al. IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation. *Nature.* 2024;627(8004):628-635. doi:10.1038/s41586-024-07098-5

110. Tie Y, Tang F, Peng D, Zhang Y, Shi H. TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. *Mol Biomed*. 2022;3(1):45. doi:10.1186/s43556-022-00109-9
111. Han Y, Yang J, Fang J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):92. doi:10.1038/s41392-022-00932-0
112. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1):e20190418. doi: 10.1084/jem.20190418. PMID: 31611251; PMCID: PMC7037253.
113. Guo Q, Jin Y, Chen X, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):53. doi:10.1038/s41392-024-01757-9
114. Wiet Ramadhanti O, Putra A, Anna Chalimah Sadyah N, Hidayah N, Prasetyo A. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cell Hipoksia dan Normoksia Terhadap Ekspresi IL-10 pada Tikus Model Luka Eksisi. *J Midwifery Health Sci Sultan Agung*. 2021;(1):23–31.

