

**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (EH-MSCs), ALPHA
ARBUTIN DAN NIACINAMIDE TERHADAP KADAR
MDA DAN EKSPRESI MITF**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6
Model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Aktifa Nurullah
MBK2423010424

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

TESIS

PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (EH-MSCs), ALPHA ARBUTIN DAN NIACINAMIDE TERHADAP KADAR MDA DAN EKSPRESI MITF

(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB)

Disusun oleh

Aktifa Nurullah
MBK 2423010424

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Senin, 25 Agustus 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II


Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan,
Sp.DVE, Subsp.DKE, FINS DV, FAADV
NIP. 130.530.279


Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B. FINACS
NIP. 210.113.160

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



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B. FINACS
NIP. 210.113.160

PERNYATAAN

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

Semarang, 25 Agustus 2025



(Aktifa Nurullah)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Aktifa Nurullah
Tempat / tanggal lahir : Tegal, 5 Oktober 1988
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK ABA Purworejo : Lulus tahun 1994
2. SD Negeri Gentra Masekdas Bekasi : Lulus tahun 2000
3. SMP Negeri 19 Bekasi : Lulus tahun 2003
4. SMA Negeri 2 Bekasi : Lulus tahun 2006
5. S1 Fakultas Kedokteran Universitas YARSI : Lulus tahun 2010
6. Profesi Dokter Universitas YARSI : Lulus tahun 2012
7. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : (2024 - Sekarang)

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Suami : Danny Ariyanto Noor Prayitno Hadi
2. Nama Anak : Manggala Arsaji Ramadhan Karim
Aisha Rara Kirana

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur terpanjatkan kepada Allah SWT yang atas rahmat, ridho dan karunia-NYA, sehingga proposal tesis yang berjudul “**Pengaruh Kombinasi Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs), Alpha Arbutin dan Niacinamide Terhadap Kadar MDA dan Ekspresi MITF (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB)**” dapat penulis selesaikan dengan baik.

Penulis menyusun tesis ini sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Sehubungan dengan hal tersebut, penulis dengan penuh hormat menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Gunarto, SH, MH selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Bapak Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Bapak Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, sekaligus sebagai pembimbing II yang telah memberikan semangat motivasi dalam penyusunan hasil tesis ini.

4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE. Subsp.DKE, FINSADV, FAADV yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan, arahan serta meluangkan waktu untuk berdiskusi dengan penulis sepanjang menjadi dosen pembimbing I.
5. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS sebagai dosen pembimbing II yang senantiasa memberikan arahan, masukan dan saran serta meluangkan waktu di tengah kesibukannya untuk mendampingi penulis dalam menyusun tesis ini.
6. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes sebagai dosen penguji pertama yang telah berkenan meluangkan pikiran dan juga waktunya untuk memberikan masukan berharga kepada penulis sepanjang proses penulisan tesis.
7. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes sebagai dosen penguji kedua yang dengan tulus meluangkan pemikiran dan waktunya guna memberi masukan kepada penulis, dalam proses penyusunan tesis ini.
8. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes sebagai dosen penguji ketiga yang dengan penuh perhatian bersedia meluangkan pemikiran dan juga waktunya serta memberikan masukan yang berarti kepada penulis dalam penyusunan tesis.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang dengan tulus memberikan ilmu yang bermanfaat di bidang Ilmu Biomedik.
10. Segenap staf administrasi program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

11. Kedua orang tua, mertua, suami, anak, saudara, keluarga, teman-teman dan karyawan AKTIFA BEAUTY CLINIC Bekasi atas segala dukungan dan doanya.
12. Kepada semua pihak termasuk rekan-rekan farmasi yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan dan membantu selama penyusunan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan tesis ini masih memiliki banyak keterbatasan, kekurangan dan memerlukan pengembangan lebih lanjut agar dapat memberikan manfaat yang lebih optimal. Maka penulis sangat berharap adanya kritik dan saran yang bisa membangun demi penyempurnaan tesis ini serta sebagai bekal dalam penelitian dan penulisan ilmiah di masa yang akan datang.

Sebagai penutup, penulis berharap tesis ini dapat menambah wawasan dan memberikan manfaat kepada semua pihak, khususnya dalam upaya pengembangan dan pembaruan ilmu pengetahuan yang berwawasan lingkungan.

Semarang, Agustus 2025

Penulis

Aktifa Nurullah

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Originalitas Penelitian.....	5
1.5. Manfaat penelitian.....	7
BAB II.....	9
TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Hiperpigmentasi.....	9
2.2. <i>Malondialdehyde</i> (MDA).....	15
2.3. Melanocyte Inducing Transcription Factor (MITF).....	17
2.4. <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i> (EH-MSC).....	24
2.5. Efek <i>Exosome hypoxia mesenchymal stem cell</i> terhadap Kadar MDA dan Eksresi MITF pada Hiperpigmentasi.....	26
2.6. Alpha Arbutin.....	29
2.7. Niacinamide.....	32
BAB III.....	35
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....	35
3.1. Kerangka Teori.....	35
3.2. Kerangka Konsep.....	38
3.3. Hipotesis.....	38

BAB IV.....	39
METODE PENELITIAN.....	39
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	39
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	40
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	42
4.4. Alat dan Bahan.....	44
4.5. Cara Penelitian.....	45
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian.....	50
4.7. Analisa Data.....	50
4.8. Alur Penelitian.....	51
BAB V.....	52
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	52
5.1. Hasil Penelitian.....	52
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	63
BAB VI.....	68
KESIMPULAN DAN SARAN.....	68
6.1. Kesimpulan.....	68
6.2. Saran.....	69
DAFTAR PUSTAKA.....	70
LAMPIRAN.....	74



DAFTAR SINGKATAN

1O2	: <i>Oksigen singlet</i>
ACTH	: <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
α -MSH	: <i>α-Melanocyte- stimulating Hormone</i>
bHLH-ZIP	: <i>Basic helix - loop - helix leucine zipper</i>
cAMP	: <i>Cyclic AMP</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
CREB	: <i>CAMP Response Element-Binding Protein</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EBC	: <i>Exhaled breath condensate</i>
EH-MSCs	: <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
GPX	: <i>Glutathione peroxidase</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen peroksida</i>
HIF	: <i>Hypoxic Induce Factor</i>
HPLC	: <i>High - Performance Liquid Chromatography</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin 1 beta</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
JNK	: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
MAPK	: <i>Mithogen-actived Protein Kinase</i>
MC1-R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>

MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
miRNA	: <i>MicroRNA</i>
MITF	: <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MVB	: <i>Multivesicular body</i>
NADH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADP ⁺	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAD ⁺	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NRF2	: <i>Nuclear factor erythroid 2 - related factor 2</i>
O ₂ ⁻	: <i>Superoksida</i>
OH ⁻	: <i>Radikal hidroksil</i>
p38 MAPK	: <i>p38 Mitogen - Activated Protein Kinase</i>
PKA	: <i>Protein kinase A</i>
POMC	: <i>Pro-opiomelanocortin</i>
qRT-PCR	: <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
TBA	: <i>Thiobarbituric acid</i>
TBARS	: <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TEWL	: <i>Transepidermal water loss</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*

TYR : *Tyrosinase*

TYRP 1 : *Tyrosinase-Related Protein 1*

TYRP2 : *Tyrosinase-Related Protein 2*

UV : *Ultraviolet*

UVA : *Ultraviolet A*

UVB : *Ultraviolet B*

UVC : *Ultraviolet C*



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	7
Tabel 5.1. Hasil analisis deskriptif rerata kadar MDA, normalitas, homogenitas dan uji <i>One Way Anova</i>	58
Tabel 5.2. Uji <i>Post Hoc Tamhane</i> pada kadar MDA.....	59
Tabel 5.3. Hasil analisis deskriptif rerata ekspresi MITF, normalitas, homogenitas dan uji <i>One Way Anova</i>	61
Tabel 5.4. Uji <i>Post Hoc Tamhane</i> pada ekspresi MITF.....	62



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Gambaran melanosit pada epidermis-dermis	10
Gambar 2.2.	Mekanisme Hiperpigmentasi	15
Gambar 2.3.	Sintesis MDA sebagai hasil peroksidasi lipid	17
Gambar 2.4.	Peran MITF dalam melanogenesis	20
Gambar 2.5.	Peran ROS dan hubungannya dengan MITF	21
Gambar 2.6.	Skema sintesis melanin	23
Gambar 2.7.	Proses pembentukan <i>exosome</i>	26
Gambar 2.8.	Mekanisme <i>Exosome</i> MSC dalam menghambat MITF	30
Gambar 2.9.	Peran arbutin dalam menghambat melanogenesis	32
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	37
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	38
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian	39
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	51
Gambar 5.1.	Morfologi MSC	52
Gambar 5.2.	Analisis Marker MSC	53
Gambar 5.3.	Diferensiasi Sel MSC	54
Gambar 5.4.	Hasil Validasi <i>Exosome</i>	55
Gambar 5.5.	Validasi Hiperpigmentasi jaringan kulit mencit C57BL/6.....	56
Gambar 5.6.	Grafik Kadar MDA($\mu\text{g/mL}$).....	60
Gambar 5.7.	Grafik Ekspresi Relatif MITF.....	63

ABSTRAK

Latar Belakang: Hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB meningkatkan stres oksidatif dan melanogenesis yang akan meningkatkan kadar malondialdehyde (MDA) dan ekspresi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF). Kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs), alpha arbutin, dan niacinamide diharapkan dapat menekan stres oksidatif dan melanogenesis. Tujuan: Menilai pengaruh kombinasi EH-MSCs 200 μ l, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% terhadap kadar MDA dan ekspresi MITF pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

Metode: Penelitian menggunakan eksperimental *in vivo* dengan rancangan *post-test only control group* menggunakan 30 ekor mencit jantan C57BL/6 yang dibagi menjadi lima kelompok: K1 (sehat), K2 (kontrol negatif), K3 (kontrol positif/topikal), K4 (EH-MSCs), dan K5 (kombinasi topikal + EH-MSCs). Induksi hiperpigmentasi dilakukan dengan paparan UVB 180 mJ/cm² selama dua minggu. Kadar MDA diukur dengan ELISA, sedangkan ekspresi MITF dianalisis menggunakan qRT-PCR. Data dianalisis dengan ANOVA dan *post hoc* sesuai homogenitas varians.

Hasil: Kadar MDA tertinggi ditemukan pada K2 ($355,74 \pm 1.770$) dan terendah pada K5 (163.62 ± 1.769). Kombinasi EH-MSCs dan topikal (K5) menurunkan kadar MDA secara signifikan dibanding K2, K3, dan K4 ($p < 0,001$). Ekspresi MITF tertinggi pada K2 dan terendah pada K4, dengan perbedaan signifikan hanya antara K1 dan K5 ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Kombinasi EH-MSCs, alpha arbutin, dan niacinamide dapat menurunkan kadar MDA dan ekspresi MITF.

Kata Kunci: Hiperpigmentasi, UVB, EH-MSCs, alpha arbutin, niacinamide, MDA, MITF

ABSTRACT

Background: Hyperpigmentation due to UVB exposure occurs through increased oxidative stress and melanogenesis pathway, which triggers elevated levels of malondialdehyde (MDA) and expression of Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF). The combination of Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs), alpha arbutin, and niacinamide suppress oxidative stress and melanogenesis. **Objective:** To evaluate the effect of combining 200 µl EH-MSCs, 5% alpha arbutin, and 4% niacinamide on MDA levels and MITF expression in UVB-induced hyperpigmentation model C57BL/6 mice.

Methods: This was an in vivo experimental study with a post-test only control group design involving 25 male C57BL/6 mice, divided into five groups: K1 (healthy), K2 (negative control), K3 (positive control/topical), K4 (EH-MSCs), and K5 (topical combination + EH-MSCs). Hyperpigmentation was induced by UVB exposure at 180 mJ/cm² for two weeks. MDA levels were measured using ELISA, while MITF expression was analyzed using qRT-PCR. Data were analyzed using ANOVA and post hoc tests according to variance homogeneity.

Results: The highest MDA levels were found in K2 (355.74 ± 1.770) and the lowest in K5 (163.62 ± 1.769). The combination of EH-MSCs and topical agents (K5) significantly reduced MDA levels compared to K2, K3, and K4 ($p < 0.001$). MITF expression was highest in K2 and lowest in K4, with a significant difference observed only between K1 and K5 ($p < 0.05$).

Conclusion: The combination of EH-MSCs, alpha arbutin, and niacinamide effectively reduces MDA levels and decreases MITF expression.

Keywords: hyperpigmentation, UVB, EH-MSCs, alpha arbutin, niacinamide, MDA, MITF

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperpigmentasi merupakan suatu kondisi dermatologis dimana terjadi penggelapan kulit di area tertentu akibat meningkatnya produksi melanin.¹ Prevalensi hiperpigmentasi, termasuk melasma, di Asia tercatat sekitar 21%, lebih tinggi dibandingkan dengan benua lain seperti Afrika (9%), Amerika (8%), dan Eropa (4%).⁴ Prevalensi melasma di Asia Tenggara dilaporkan mencapai 40% pada wanita dan 20% pada pria. Sebuah studi di Departemen Dermatologi dan Venereologi Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) Jakarta pada tahun 2014 menunjukkan bahwa pasien dengan gangguan hiperpigmentasi mencakup 33,6% dari total 4.559 kunjungan.⁷ Sinar UV B dengan panjang gelombang 280-320nm, sebagian besar diserap oleh lapisan terluar kulit (stratum korneum) dan merangsang pembentukan melanin.⁶ Energi UVB berinteraksi dengan kromofor di kulit seperti flavin, porfirin, NADH, triptofan dan tirosin. Proses ini menghasilkan radikal bebas atau ROS yang memicu kerusakan komponen seluler seperti lipid, protein, dan DNA. MDA yang terbentuk selama peroksidasi lipid adalah produk akhir yang penting dan biomarker dari stres oksidatif. Peningkatan kadar MDA ini berkorelasi dengan peningkatan produksi melanin pada melanosit, sebagai respons tubuh terhadap paparan UVB. Oleh karena itu, paparan UVB tidak hanya meningkatkan kadar ROS dan MDA, tetapi juga merangsang melanogenesis.⁸ Signaling utama yang mengatur melanogenesis melibatkan

beberapa jalur, yang paling penting adalah MC1-R (*Melanocortin -1 Receptor*). MC1-R diaktifkan oleh α - *Melanocyte-stimulating Hormone* (α -MSH) atau *Adrenocorticotrophic Hormone* (ACTH), yang keduanya merupakan produk dari *pro-opiomelanocortin* (POMC). Aktivasi MC1-R meningkatkan sintesis cAMP (*cyclic AMP*) yang kemudian mengaktifkan *protein kinase A* (PKA). PKA akan memfosforilasi CREB (*cAMP response element- binding protein*), yang berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*). MITF adalah faktor transkripsi utama yang mengatur ekspresi enzim-enzim melanogenik seperti *tyrosinase*, TYRP1, dan TYRP2, yang sangat penting dalam proses sintesis melanin.^{9,10}

Hydroquinone dan asam retinoat masih menjadi terapi konvensional pada pengobatan hiperpigmentasi karena mekanismenya terhadap penghambatan enzim *tyrosinase*.^{2,11} *Hydroquinone* merupakan agen kimia yang apabila penggunaan diberikan jangka panjang maka akan terjadi efek samping seperti iritasi, ochronosis, sensitifitas kulit, dermatitis bahkan kanker kulit.¹²⁻¹⁴ Studi terkini mengatakan bahwa arbutin memiliki toleransi yang lebih tinggi pada kulit dan minimal efek samping jika dibandingkan dengan agen pencerah kulit seperti *hydroquinone*, dan asam retinoat.¹² Niacinamide dan alpha arbutin yang dapat mengurangi pigmentasi kulit karena memiliki pengaruh penghambatan terhadap proses melanogenesis yang lebih aman dibandingkan dengan *hydroquinone*. Alpha arbutin dapat menurunkan biosintesis melanin melalui jalur penghambatan aktivitas enzim *tyrosinase*.¹⁵ Selain itu Alpha arbutin juga dapat menekan pembentukan dari ROS.¹⁶ Niacinamide menghambat transfer melanosome dari

dalam melanosit ke keratinosit.¹⁷ Niacinamide memiliki berbagai macam manfaat seperti menetralkan kadar ROS, antipriuritik, antimikroba, vasoaktif, seboostatik, bahkan dipercaya dapat mengatasi masalah kulit berupa melasma dan hiperpigmentasi.¹⁸

Dewasa ini, terapi berbasis *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) khususnya *exosome MSCs*, mulai menarik perhatian karena kemampuannya dalam memperbaiki jaringan dan mengatur proses regenerasi kulit melalui efek parakrin.¹⁹ *Exosome* mempengaruhi pigmentasi dengan mengubah ekspresi gen dan aktivitas enzim.²⁰ *Exosome MSCs* yang dikondisikan dalam lingkungan hipoksia (EH-MSCs) diketahui memiliki kandungan faktor pertumbuhan dan antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan *exosome* dari MSCs normoksia, sehingga berpotensi lebih kuat dalam menekan proses hiperpigmentasi yang dimediasi oleh stres oksidatif.²¹

Latar belakang tersebut yang akhirnya membuat peneliti tertarik melakukan penelitian ini untuk menilai efektifitas pemberian cairan injeksi *exosome hypoxia* MSC dengan konsentrasi 200 µl secara tunggal dan kombinasi dengan alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% dalam sediaan topikal pada kadar MDA dan ekspresi MITF kulit mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB secara *in vivo*.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 µl, alpha arbutin 5% dan

niacinamide 4% terhadap kadar MDA dan ekspresi MITF pada mencit C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi sinar UVB ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini mempunyai tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) dan Alpha arbutin dengan Niacinamide terhadap Kadar MDA dan Ekspresi MITF yang diinduksi Sinar UVB pada Mencit C57BL/6 model Hiperpigmentasi.

1.3.2. Tujuan khusus

1.3.2.1. Penelitian ini mempunyai tujuan membuktikan perbedaan Kadar MDA pada Mencit C57BL/6 model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB yang diberikan kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.3.2.2. Penelitian ini mempunyai tujuan membuktikan perbedaan Ekspresi MITF pada Mencit C57BL/6 model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB yang diberikan kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Metode	Hasil
1.	Xiao Yu Wang, <i>et al</i> , 2021	<i>Human amniotic stem cells - derived exosomal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively.</i>	Pemberian sel punca amnion manusia (hASC), termasuk sel punca mesenkimal amnion manusia (hAMSC) dan sel punca epitel amnion manusia (hAESC).	miR-181a-5p dan miR-199a yang berasal dari eksosom hASC secara signifikan menghambat melanogenesis dengan menekan MITF (faktor transkripsi terkait mikroftalmia) yang merupakan regulator utama untuk mengatur melanogenesis dan mendorong degradasi melanosom melalui pengaktifan autofagi.

- | | | | | |
|----|------------------------------|--|--|---|
| 2. | Ilaria Proietti, et al, 2024 | <i>Efficacy and Tolerrability of a Microneedling Device Plus Exosomes for Treating Melasma.</i> | Pemberian kombinasi terapi microneedling dengan aplikasi topikal eksosom yang berasal dari sel punca Rosa damascena. | Kombinasi microneedling dan eksosom dapat menjadi pendekatan yang aman dan efektif untuk mengobati melasma, terutama pada kasus dengan tingkat keparahan sedang hingga berat. |
| 3. | He et al., 2019 | <i>MSCS - Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneus Wound Healing</i> | Pemberian miR-223 dari exosomes MSCs | Exosome MSCs dapat membantu mempercepat proses penyembuhan luka pada tikus C57BL. |
| 4. | A Yeon Park, et al, 2023 | <i>Exosome derived from human dermal fibroblasts protect against UVB-induced skin photoaging</i> | Pemberian BJ5ta Exosome pada kulit tikus SKH1 yang telah terpapar UVB | Hasil penelitian menunjukkan bahwa BJ-5ta Exo menurunkan produksi Reactive Oxygen Species dan menghambat penurunan Kadar SOD 1 dan 2, glutation peroksidase dan katalase setelah paparan UVB. |

- | | | | | |
|----|------------------------------------|--|--|---|
| 5. | Seung Ho Choi, <i>et al</i> , 2015 | <i>Aloesin inhibits hyperpigmentation induced by UV radiation.</i> | Pemberian aloesin, senyawa yang diisolasi dari Aloe vera, yang diaplikasikan secara topikal pada kulit yang telah terpapar radiasi ultraviolet (UV). | Aloesin menghambat hiperpigmentasi yang diinduksi oleh radiasi UV. menurunkan pigmentasi sebesar 34%, arbutin sebesar 43,5%, dan kombinasi aloesin serta arbutin sebesar 63,3%. Penelitian ini menyimpulkan bahwa aloesin memiliki efek penghambatan pada hiperpigmentasi yang diinduksi oleh radiasi UV. |
|----|------------------------------------|--|--|---|



1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah peran *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 µl dan Alpha arbutin 5% dengan Niacinamide 4% terhadap Kadar MDA dan Ekspresi MITF pada Mencit model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB.

1.5.2. Manfaat Praktis

1.5.2.1. Penelitian ini diharapkan memberikan pengetahuan yang aplikatif bagi masyarakat mengenai kegunaan kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 µl dan Alpha arbutin 5% dengan Niacinamide 4% untuk pengobatan pigmentasi pada kulit.

1.5.2.2. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan pengetahuan baru tentang potensi terapi dengan kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 µl dan Alpha arbutin 5% dengan Niacinamide 4% sebagai agen anti radikal bebas bagi populasi yang mendapat paparan Sinar UVB setiap hari dengan intensitas tinggi.



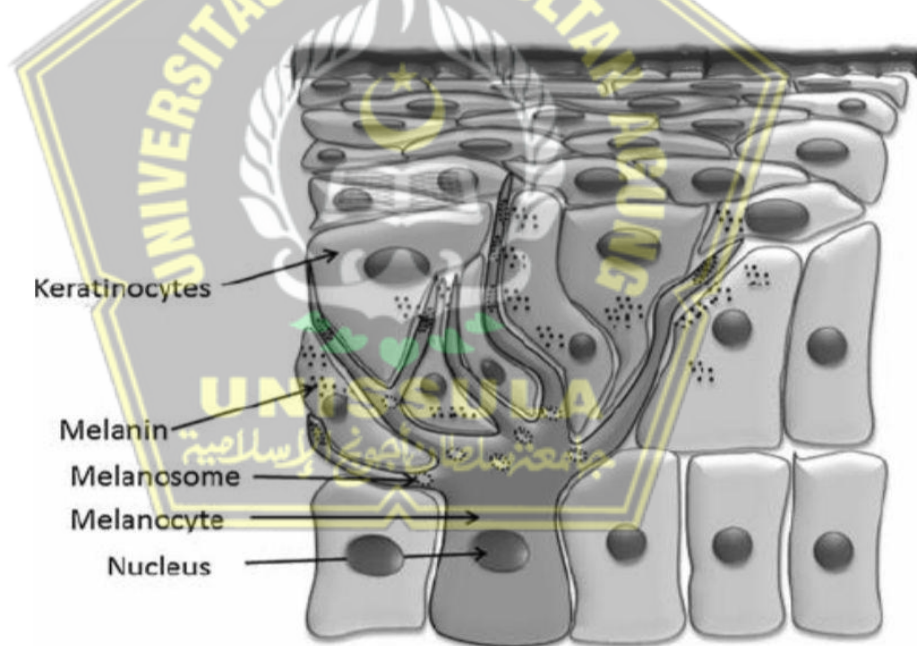
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hiperpigmentasi

2.1.1. Definisi

Hiperpigmentasi adalah kondisi yang ditandai dengan peningkatan produksi melanin yang berlebihan sehingga menyebabkan munculnya bercak atau penggelapan warna kulit di area tertentu dibandingkan dengan area yang lain pada permukaan kulit.²³



Gambar 2.1. Gambaran melanosit pada epidermis-dermis²⁴

Melanin adalah pigmen warna kulit yang diproses oleh melanosit di epidermis kulit dan berperan penting dalam melindungi kulit dari kerusakan akibat paparan sinar ultraviolet (UV).²⁵ Sel pigmen dalam

tubuh manusia diperkirakan berjumlah sekitar 1,5 gram, yang sebagian besar diproduksi oleh melanosit yang terletak di epidermis. Proses produksi melanin, yang dikenal sebagai melanogenesis, terdiri dari beberapa tahap yaitu produksi melanin di dalam melanosom oleh melanosit, serta transfer granula pigmen tersebut melalui dendrit menuju keratinosit pada epidermis. Setiap melanosit dalam epidermis berinteraksi dengan sel-sel epidermal untuk membentuk apa yang disebut sebagai "epidermal melanin unit". Meskipun jumlah epidermal melanin unit ini bervariasi di berbagai area, jumlah keratinosit yang dilayani oleh setiap melanosit tetap konstan, yakni sekitar 36 keratinosit untuk setiap melanosit. Jumlah melanosit juga berbeda-beda tergantung pada area tubuh. Melanosit terletak di lapisan basal epidermis, dengan jumlah melanosit yang bervariasi sesuai dengan ras dan jenis kelamin. Kapasitas melanosit dalam menghasilkan melanin juga berbeda, baik pada kondisi basal (warna konstitutif) maupun setelah terpapar sinar matahari (warna fakultatif). Individu dengan kulit gelap memiliki kapasitas melanosit yang lebih tinggi untuk memproduksi dan mentransfer melanin ke keratinosit, sementara individu dengan kulit terang memiliki kapasitas yang lebih terbatas. Melanosit ditemukan di hampir seluruh jaringan tubuh, tetapi jumlah terbanyak ada pada epidermis, folikel rambut, dan mata. Seiring bertambahnya usia, jumlah melanosit akan menurun sekitar 6-8% per dekade. Kepadatan melanosit di lapisan epidermis individu yang terpapar sinar matahari menunjukkan dua kali lipat lebih tinggi

dibanding dengan kulit yang tidak terpapar sinar matahari. Paparan sinar UV dan α -MSH (*Melanocyte-stimulating hormone*) akan menstimulasi proses transfer melanosom ke keratinosit.²⁴

2.1.2. Etiologi Hiperpigmentasi

Etiologi hiperpigmentasi mencakup beberapa penyebab utama yang dapat mempengaruhi pembentukan pigmentasi berlebih pada kulit. Berikut ini adalah beberapa faktor penyebab utama hiperpigmentasi :

- a. Paparan sinar ultraviolet (UV) adalah faktor eksogen utama yang menyebabkan stres oksidatif pada kulit, memicu proses peradangan dan kerusakan pada lapisan epidermis. Sinar UV meningkatkan aktivitas melanosit (sel yang menghasilkan melanin), yang kemudian menghasilkan lebih banyak pigmen yang akan terkumpul di area yang mengalami peradangan.^{26,27} Paparan UV terbagi menjadi dua jenis: UVA (panjang gelombang lebih panjang) dan UVB (panjang gelombang lebih pendek). UVA menembus lebih dalam ke kulit dan menyebabkan pigmentasi segera (melanin terbentuk cepat setelah paparan), sedangkan UVB lebih sering menyebabkan kerusakan langsung pada DNA dan memicu respons inflamasi yang dapat berujung pada hiperpigmentasi jangka panjang.²⁸ Paparan sinar UVB menghasilkan radikal bebas seperti singlet oksigen (1O_2), superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($OH^\cdot$) merusak komponen seluler tetapi juga berfungsi sebagai sinyal yang meningkatkan ekspresi MITF. Proses ini terjadi melalui jalur MAPK yang diaktifkan oleh ROS, yang pada akhirnya

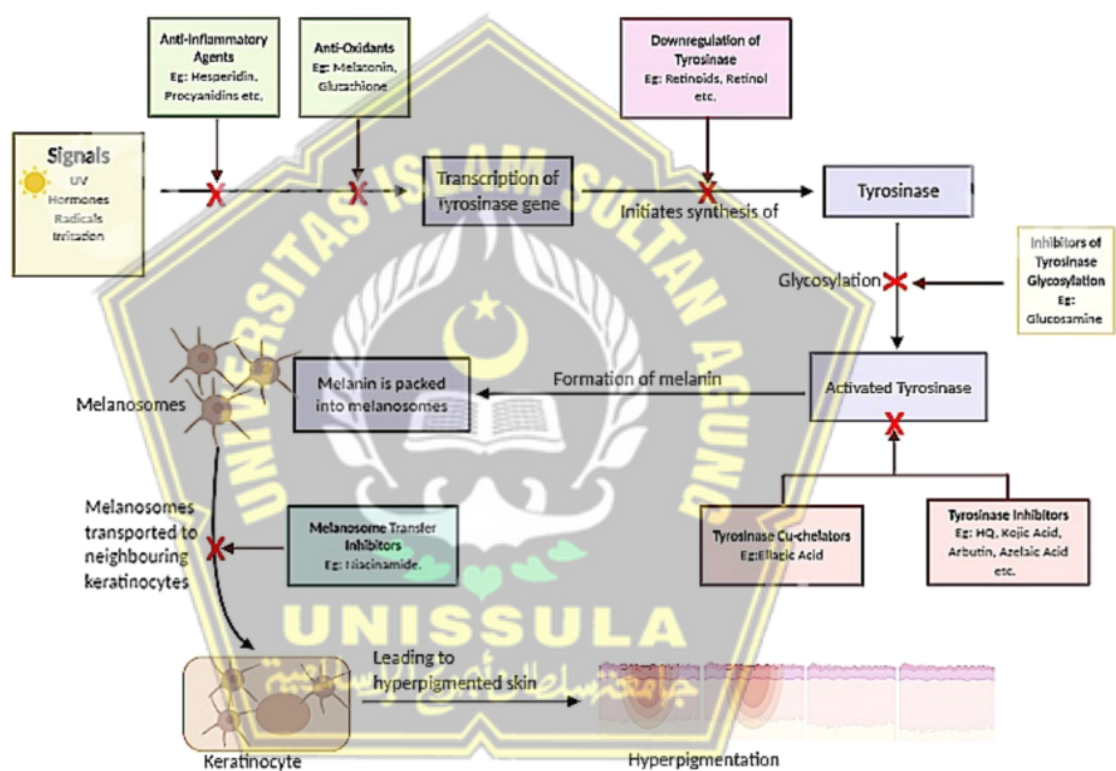
mengarah pada peningkatan ekspresi MITF dan enzim-enzim melanogenik seperti tirosinase, yang mendorong produksi melanin^{29,30}

- b. Peradangan Kulit adalah faktor utama dalam hiperpigmentasi pasca-peradangan (PIH). PIH terjadi setelah peradangan yang disebabkan oleh kondisi medis atau faktor eksternal. Misalnya, jerawat, dermatitis, kontak dermatitis, atau luka bakar dapat menyebabkan kerusakan kulit yang kemudian diikuti dengan pembentukan bintik hitam atau hiperpigmentasi setelah proses penyembuhan. Proses inflamasi ini meningkatkan produksi melanin sebagai bagian dari respons kulit untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi. Namun, proses ini dapat mengarah pada penumpukan melanin yang berlebihan di area yang terpengaruh. Proses inflamasi meningkatkan pelepasan berbagai mediator kimia, seperti prostaglandin E2, IL-1, TNF- α , dan COX-2, yang merangsang aktivitas melanosit dan melanin sintesis.^{31,32}
- c. Obat-obatan dapat meningkatkan kerja dari melanosit dan menyebabkan pigmentasi kulit terbentuk pada kulit di area wajah pada individu yang terkena cahaya matahari intens yaitu, obat psikotropik seperti fenotiazin (klorpromazin), amiodaron, minosiklin, sitostatika, logam berat, tetrasiklin, arsen inorganik, klorokuin dan obat antikonvulsan seperti fenitoin, hidantoin, barbiturat dan dilantin.³³ Obat - obatan lain yang juga berpengaruh besar dalam menyebabkan hiperpigmentasi kulit adalah kontrasepsi oral. Pemeriksaan mikroskopik pada epidermis ditemukan peningkatan jumlah melanin dan ukuran sel melanosit yang membesar.

Logam berat seperti emas, perak, arsenik dan bismuth dapat juga menyebabkan pigmentasi dengan mengikat dan menghilangkan komponen sulfhidril sehingga menstimulasi proses melanogenesis.³⁴

- d. Faktor hormonal juga memiliki pengaruh besar terhadap produksi melanin, khususnya pada kondisi seperti melasma. Melasma pada wanita sering terjadi terutama pada masa kehamilan atau penggunaan pil kontrasepsi yang mengandung estrogen dan progesteron. Hormon-hormon ini merangsang melanogenesis (pembentukan melanin) di kulit yang lebih banyak terpapar sinar matahari, menyebabkan pembentukan bercak gelap, terutama pada wajah.³⁴
- e. Faktor Genetik juga memainkan peran penting dalam mempengaruhi warna kulit dan potensi pengembangan hiperpigmentasi. Beberapa individu mungkin memiliki kecenderungan genetik untuk menghasilkan lebih banyak melanin atau untuk lebih sensitif terhadap faktor-faktor pemicu melanin, seperti paparan UV. Hal ini berhubungan dengan variasi jumlah dan ukuran melanosit serta distribusi melanosom (organela pengandung melanin) di kulit, yang bervariasi antar ras.²⁸ Individu dengan kulit yang terlihat lebih gelap (seperti pada tipe kulit Fitzpatrick III – VI) lebih rentan terhadap PIH dan melasma, karena melanin yang lebih banyak dalam kulit mereka lebih mudah terstimulasi oleh paparan UV atau peradangan.^{31,32}
- f. Cedera atau Trauma pada Kulit atau trauma mekanik, seperti goresan, luka bakar, atau cedera fisik lainnya, dapat menyebabkan

hiperpigmentasi. Proses penyembuhan luka dapat merangsang produksi melanin yang berlebihan di area yang rusak. Ketika kulit sembuh, area tersebut cenderung menjadi lebih gelap sebagai bagian dari respon tubuh terhadap kerusakan yang terjadi.^{25,28}



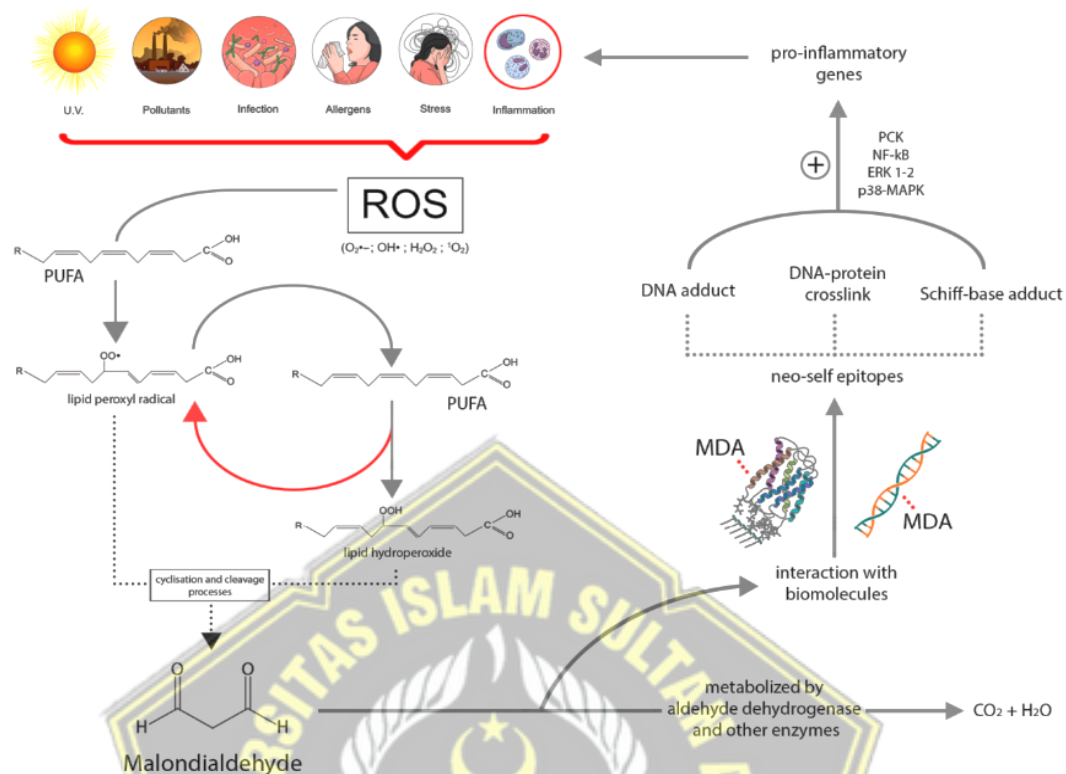
Gambar 2.2. Mekanisme Hiperpigmentasi¹

2.2. *Malondialdehyde (MDA)*

2.2.1. Definisi

Malondialdehyde (MDA) yaitu produk yang terbentuk dari peroksidasi lipid dikarenakan putusnya rantai asam lemak yang membuat senyawa racun bagi sel. Peroksidasi lipid terjadi ketika radikal bebas antara lain singlet oksigen (1O_2), hidrogen peroksida (H_2O_2), superoksida (O_2^-) dan radikal hidroksil ($OH^\cdot$) mencari pasangan elektronnya pada asam lemak tak jenuh di membran sel. Reaksi peroksidasi lipid ini menyebabkan pembentukan lipid peroksil radikal dan lipid hidroperoksida yang pada akhirnya menghasilkan produk sekunder, salah satunya adalah malondialdehyde (MDA).^{41,46}

MDA berfungsi sebagai biomarker untuk stres oksidatif. Ketika kadar MDA meningkat, itu menandakan adanya kerusakan oksidatif yang signifikan pada membran sel, yang dapat menyebabkan gangguan fungsional dalam sel dan organ. MDA dapat mengikat dengan biomolekul seperti protein dan DNA, menghasilkan adduksi yang berpotensi merusak struktur genetik dan mengganggu fungsi sel. Oleh karena itu, pengukuran MDA dapat digunakan untuk memantau tingkat stres oksidatif dalam tubuh, serta untuk mengevaluasi kerusakan yang disebabkan oleh paparan radikal bebas dalam berbagai kondisi penyakit.^{41,47}



Gambar 2.3. Sintesis MDA sebagai hasil peroksidasi lipid⁴⁶

2.2.2. Malondialdehyde sebagai Indikator Stres Oksidatif

Malondialdehyde (MDA) digunakan sebagai indikator stres oksidatif dalam berbagai kondisi penyakit seperti *acne vulgaris*, *atopic dermatitis*, melasma, psoriasis, dan vitiligo. Peningkatan kadar MDA dalam serum atau jaringan tubuh menunjukkan adanya peroksidasi lipid yang terjadi, yang berhubungan dengan kerusakan sel dan jaringan akibat radikal bebas.⁴⁷ Sebagai indikator yang stabil, MDA banyak digunakan untuk menilai status oksidatif dalam sampel biologis seperti darah, urin, dan *exhaled breath condensate* (EBC).⁴⁸ Untuk mengukur kadar MDA, beberapa metode dapat digunakan, salah satunya adalah metode

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). Metode ini melibatkan reaksi antara MDA dan *thiobarbituric acid* (TBA) yang menghasilkan zat warna yang bisa diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu. Selain itu, pengukuran MDA juga dapat dilakukan menggunakan *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) atau *Enzyme - Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), yang dapat memberikan sensitivitas tinggi dalam mendeteksi kadar MDA dalam plasma atau serum.^{48,49}

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

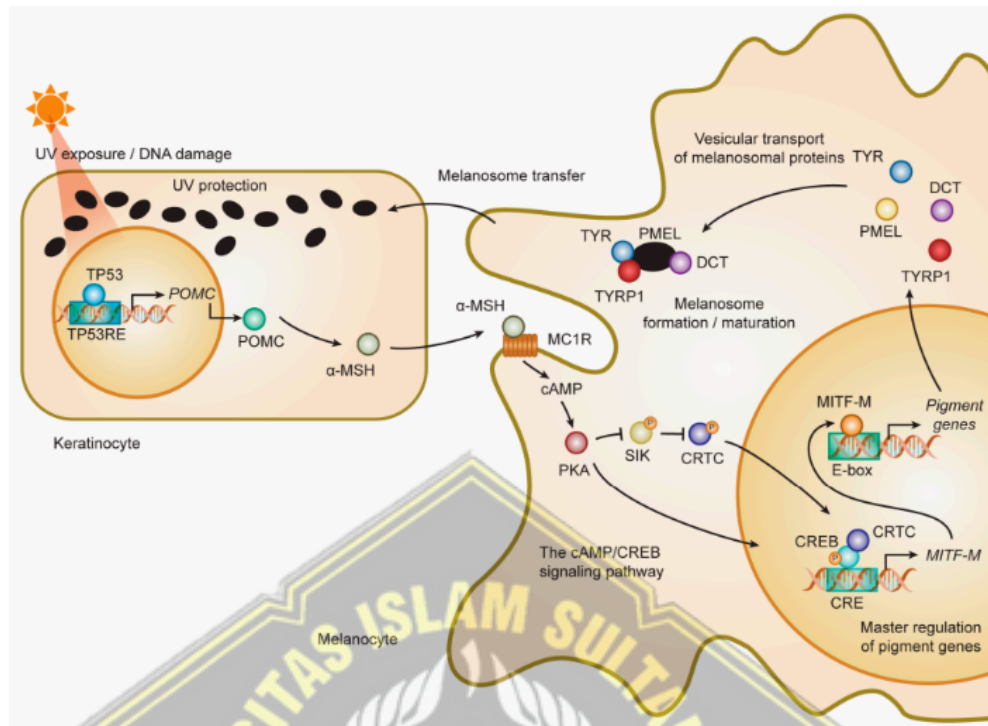
2.3.1. Definisi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF)

Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF) merupakan protein faktor transkripsi yang merupakan master regulator dalam proses produksi melanin di sel melanosit. Faktor transkripsi adalah rantai asam amino pengikat DNA yang berperan dalam mengatur proses transkripsi gen dengan berikatan pada daerah promotor atau enhancer dari DNA. MITF dapat mengontrol diferensiasi dan perkembangan sel melanosit yang memproduksi melanin sehingga dapat memberikan warna pada rambut, mata dan kulit manusia.^{35,36} MITF pertama kali ditemukan sebagai faktor yang berperan dalam perkembangan mata pada tikus, dan karena itu diberi nama "microphthalmia" (mata kecil).^{36,37} MITF adalah bagian dari keluarga faktor transkripsi *basic helix-loop-helix leucine zipper* (bHLH-ZIP), yang memiliki domain pengikatan DNA untuk mengatur ekspresi gen-gen tertentu. MITF terikat

pada elemen respons DNA yang dikenal sebagai E-box, yang memungkinkan transkripsi DNA dari protein, dan enzim yang terlibat dalam sintesis melanin, seperti gen *tyrosinase*, *tyrosinase-related protein-1* (TYRP-1) dan *tyrosinase-related protein-2* (TYRP-2).^{30,35,37} Dalam hiperpigmentasi, MITF dapat mempengaruhi gen pembentuk pigmen sehingga berpengaruh pada jumlah dan aktivitas melanosit.^{30,39}

2.3.2. Peran MITF dalam melanogenesis

Penelitian membuktikan bahwa MITF berperan penting dalam mengatur produksi melanin yang berlebihan yang dapat ditemukan pada berbagai macam kondisi hiperpigmentasi seperti lentigo dan melasma.³⁸ Faktor eksternal yang dapat mempengaruhi tingkat ekspresi serta aktivitas MITF yaitu paparan sinar ultraviolet yang berlebihan atau perubahan hormonal.²⁹ Variasi genetik pada gen MITF dapat mengganggu proses regulasi pembentukan melanin (melanogenesis) dan berperan dalam timbulnya hiperpigmentasi yang berhubungan dengan kelainan seperti sindrom *piebaldism* atau sindrom *Waardenburg*.^{36, 39}

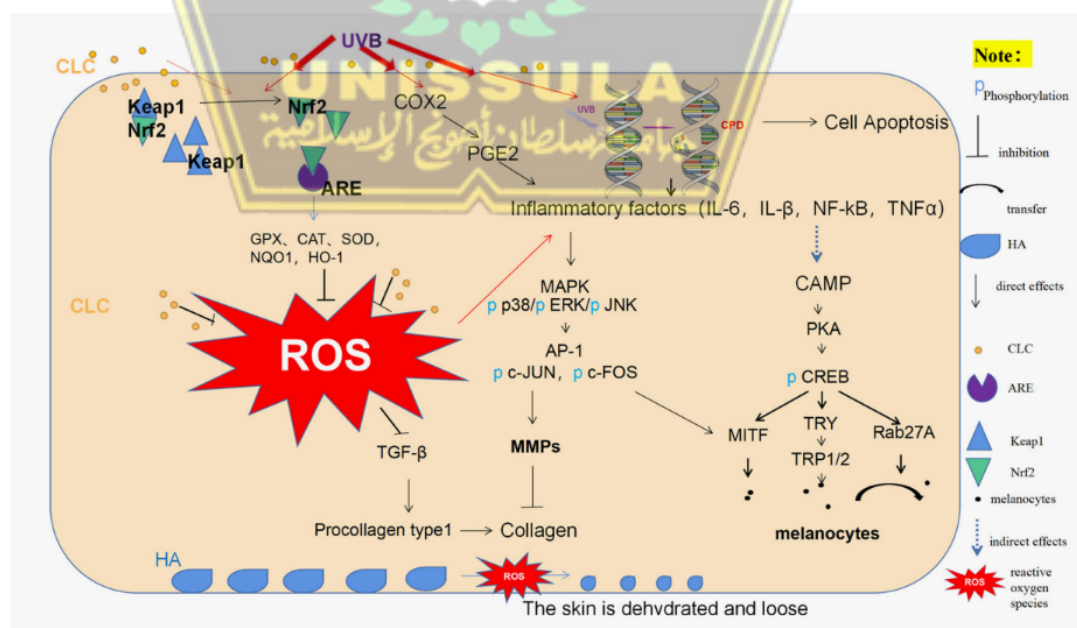


Gambar 2.4. Peran MITF dalam melanogenesis³⁹

Paparan ultraviolet B (UVB) berfungsi sebagai salah satu pemicu utama untuk aktivasi MITF. Sinar UVB menyebabkan kerusakan DNA pada kulit yang mendorong sel-sel keratinosit, untuk mengeluarkan α - melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). Hormon ini berikatan dengan MC1R (*Melanocortin 1 Receptor*) pada melanosit, yang memicu peningkatan kadar cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) dalam sel melanosit. Peningkatan cAMP ini membuat aktifnya *protein kinase A* (PKA), yang akan memicu memfosforilasi dan mengaktifkan CREB (*cAMP-response element-binding protein*). Aktivasi CREB kemudian meningkatkan ekspresi MITF, yang berperan penting dalam mengatur ekspresi gen-gen melanogenik seperti *tyrosinase*, TYRP1, dan TYRP2.

Enzim ini terlibat langsung dalam peningkatan jumlah melanin, yang memberikan perlindungan terhadap kerusakan akibat paparan UV.^{29,40}

Selain aktivasi oleh MC1R, paparan UVB juga meningkatkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang berfungsi sebagai sinyal untuk merangsang proses melanogenesis. ROS, seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) dan superoksida ($O_2^{\bullet-}$), menginduksi jalur aktivasi dari sinyal MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), termasuk p38 MAPK dan ERK. Aktivasi MAPK ini dapat langsung mempengaruhi ekspresi MITF melalui fosforilasi, yang pada gilirannya mengarah pada peningkatan sintesis melanin. Dengan demikian, ROS tidak hanya menyebabkan kerusakan oksidatif tetapi juga memperkuat proses melanogenesis dengan meningkatkan ekspresi MITF dan enzim melanogenik.³⁰

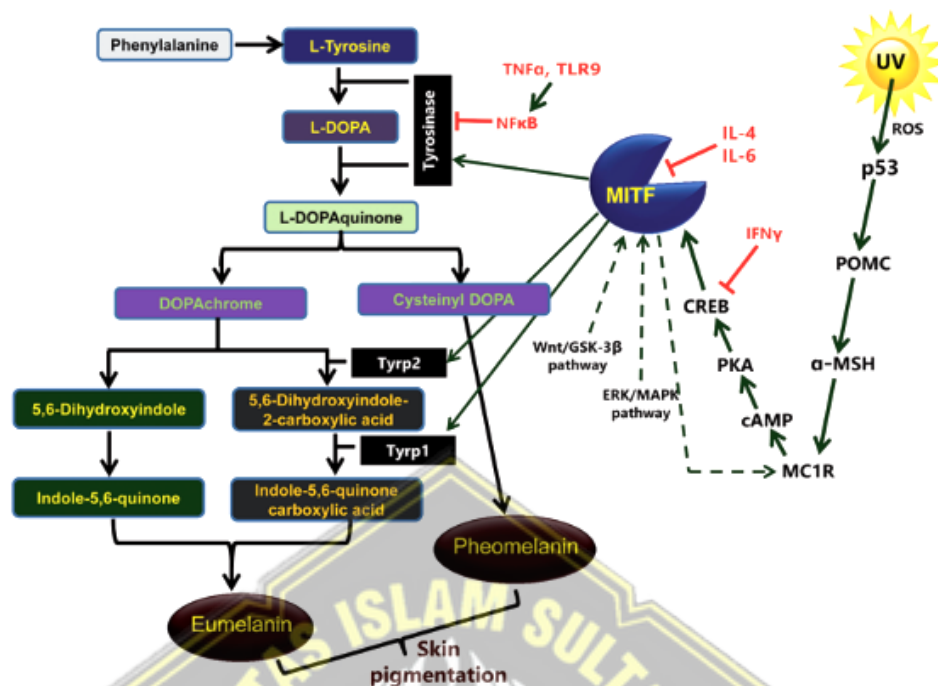


Gambar 2.5. Peran ROS dan hubungannya dengan MITF⁴¹

2.3.3. Melanin

Melanin merupakan kelompok besar molekul yang berperan penting dalam berbagai fungsi biologis, termasuk pigmentasi kulit dan rambut serta perlindungan fotoprotektif pada kulit dan mata.⁴² Pigmen ini disintesis secara endogen oleh melanosit, yaitu sel khusus penghasil melanin yang terdapat pada kulit, folikel rambut, mata, telinga bagian dalam, tulang, jantung, dan otak manusia.⁹ Melanosit berasal dari sel punca saraf pluripoten yang berdiferensiasi sebagai respons terhadap jaringan kompleks jalur regulasi yang saling berinteraksi. Peran utama melanin adalah melindungi kulit dari kerusakan yang ditimbulkan oleh paparan sinar ultraviolet maupun bahan kimia berbahaya.³⁰

Melanin terdiri dari dua macam yaitu eumelanin yang berwarna hitam kecoklatan yang disintesis dari *DOPAchrome* dan *pheomelanin* dengan warna kuning kemerahan yang sintesisnya tergantung pada keberadaan senyawa sistein dalam melanosom.⁴³ Individu dengan melanosit yang menghasilkan lebih banyak pheomelanin daripada eumelanin cenderung memiliki kulit yang lebih terang dan lebih rentan terhadap melepuh dan terbakar. Kulit yang memiliki pheomelanin juga menghasilkan lebih banyak spesies oksigen reaktif, yang dapat mempercepat karsinogenesis dibandingkan dengan kulit yang menghasilkan *eumelanin*.^{9,43,44}



Gambar 2.6. Skema sintesis melanin⁴³

Proses pembentukan melanin melibatkan reaksi penambahan intramolekuler gugus amino pada enzim TYRP-2 sehingga terbentuk DOPAchrome. Setelah L-DOPAquinone terbentuk, jalur melanogenesis bercabang menjadi dua arah utama, yakni menuju sintesis *eumelanin* berwarna coklat kehitaman serta *pheomelanin* berwarna merah kekuningan. Pada jalur *eumelanogenesis*, DOPAchrome dapat mengalami konversi spontan menjadi 5,6-dihidroksiindol atau diubah secara enzimatis oleh TYRP-2 menjadi asam 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilat. Tahap akhir proses ini ditandai dengan polimerisasi indol dan kuinon yang menghasilkan *eumelanin*.⁴³ Pembentukan *pheomelanin* sangat dipengaruhi oleh ketersediaan sistein. Senyawa ini bereaksi dengan L-DOPAquinone membentuk

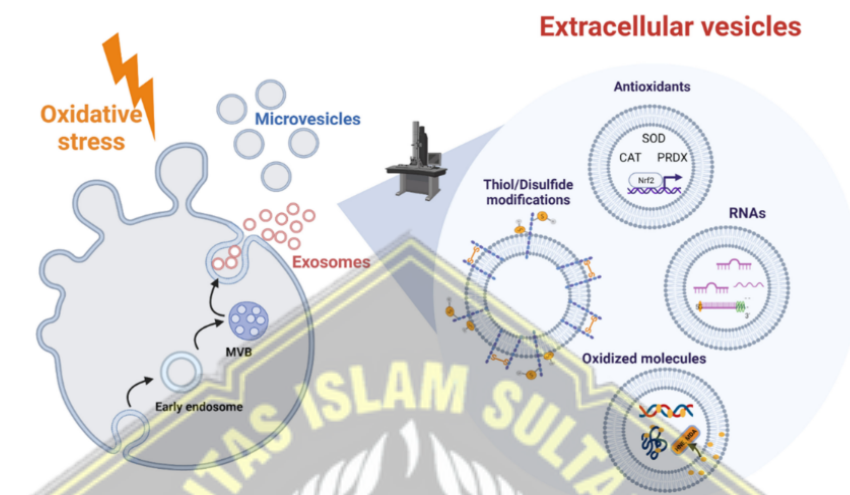
sisteinil-DOPA yang kemudian dimodifikasi menjadi kuinolin, sebelum akhirnya mengalami polimerisasi menjadi *pheomelanin*. Walaupun melanin berfungsi penting sebagai protektor kulit terhadap paparan radiasi ultraviolet (khususnya UVB), produksi dan akumulasi melanin berlebihan maupun abnormal pada kulit dapat menimbulkan kondisi hiperpigmentasi.^{9,43}

Paparan radiasi ultraviolet B menginduksi jalur melanogenesis melalui adanya sinyal kerusakan DNA. Kerusakan DNA tersebut akhirnya akan mengaktifasi protein faktor transkripsi p53.⁴³ Protein p53 yang teraktivasi akan menempel pada DNA dari proopiomelanocortin (POMC) dan mengakibatkan ekspresi gen promotor tersebut. Gen POMC yang telah aktif tersebut akan dipotong menjadi peptida-peptida kecil, seperti α -MSH, β -MSH, lipotropin, CLIP dan ACTH. α -MSH yang berasal dari protein POMC dalam keratinosit akan mengaktifkan reseptor melanocortin-1 (MC1R) pada melanosit dan mengaktifkan jalur pembentukan melanin.⁴³ Ikatan hormon α -MSH dan reseptor melanocortin-1 akan menyebabkan perubahan ATP (*Adenosine Trifosfat*) menjadi cAMP (*Cyclic Adenosine Monophosphate*) dan pada akhirnya akan mengaktifasi protein kinase A (PKA). Protein kinase A kemudian memfosforilasi berbagai protein target termasuk faktor transkripsi CREB (*cAMP-response element-binding protein*) yang pada akhirnya dapat meningkatkan ekspresi gen *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF).⁶⁴ MITF termasuk ke dalam famili faktor transkripsi *helix*

- *loop-helix-leucine zipper* (bHLH-LZ) dan dapat mengikat DNA dan mengatur ekspresi enzim yang memicu terbentuknya melanin seperti *tyrosinase*, TYRP-1 dan TYRP-2.^{30,45}

2.4. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (EH-MSC)*

Exosome adalah vesikel ekstraseluler kecil yang dilepaskan oleh hampir semua jenis sel dalam tubuh dan memiliki diameter sekitar 30 hingga 120 nanometer. *Exosome* ini memiliki membran lipida ganda dan berfungsi sebagai penghubung antara sel-sel, mengantarkan berbagai molekul bioaktif seperti protein, asam nukleat (termasuk miRNA, mRNA, dan DNA), serta lipid, yang berperan dalam komunikasi antar sel.^{22,50,51} *Exosome* terbentuk melalui proses pembentukan endosom di dalam sel. Endosom ini akan mengalami pematangan dan membentuk *multivesicular body* (MVB), yang kemudian akan melepaskan vesikel-vesikel kecil (yang disebut *exosome*) ke luar sel melalui proses fusi dengan membran sel. Molekul-molekul yang terdapat dalam *exosome* tersebut, seperti miRNA dan protein, dapat diangkut ke sel penerima (target) dan memengaruhi fungsi sel tersebut, misalnya dalam proses proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan bahkan kematian sel.^{52,53} *Exosome MSC (mesenchymal stem cells)* memiliki potensi besar sebagai alat komunikasi antar sel dalam terapi medis, karena mereka dapat membawa molekul-molekul bioaktif yang memengaruhi berbagai proses fisiologis di tubuh, seperti penyembuhan luka, pengaturan respons imun, dan regenerasi jaringan. Salah satu aspek yang membuat *exosome MSC* menarik untuk terapi medis adalah kemampuannya untuk menghindari respons imun tubuh yang sering terjadi pada terapi sel punca tradisional.^{6,49}



Gambar 2.7. Proses pembentukan *exosome*⁵³

Hipoksia yaitu kondisi dengan kadar oksigen rendah, mempengaruhi produksi dan sekresi *exosome* pada bermacam-macam jenis sel kanker dan sel dalam sistem saraf pusat (SSP). Pada kanker, hipoksia merangsang pelepasan exosom, yang terlibat dalam berbagai proses seperti angiogenesis (pembentukan pembuluh darah), modulasi imun, metastasis, dan perkembangan tumor.^{52,54} Kultur sel dalam kondisi hipoksia menyebabkan pembentukan molekul HIF (*Hypoxic Induce Factor*), yang membantu MSCs memproduksi lebih banyak sitokin. Di bawah kondisi hipoksia, komposisi muatan exosom mengalami perubahan. Misalnya, beberapa miRNA (seperti miR-21, miR-10a) dan protein (seperti VEGF dan HIF-1 α) terakumulasi lebih banyak dalam exosom yang dilepaskan oleh sel kanker. Muatan-muatan ini dapat mempengaruhi perilaku sel penerima, seperti

merangsang proliferasi (perkembangan) sel tumor, migrasi, dan invasi.^{54,55} Hipoksia juga berhubungan dengan perubahan ukuran exosom. Misalnya, *exosome* yang berasal dari sel tumor hipoksik cenderung lebih kecil, yang dapat meningkatkan kemampuan mereka untuk bergerak melalui aliran darah dan mencapai lokasi yang jauh, sehingga berpotensi memfasilitasi metastasis.⁵⁴ Penyerapan *exosome* hipoksik oleh sel penerima dapat menghasilkan berbagai efek biologis, seperti peningkatan angiogenesis di sel endotel, modulasi imun di makrofag, dan resistensi terhadap terapi pada sel kanker.^{52,54}

2.5. *Exosome hypoxia mesenchymal stem cell* terhadap Kadar MDA dan Ekspresi MITF pada Hiperpigmentasi

2.5.1. Mekanisme *Exosome* dalam Menurunkan MDA

MDA (*malondialdehyde*) yaitu produk sampingan dari peroksidase lipid yang merupakan salah satu penanda kerusakan sel akibat ROS. Penelitian menunjukkan bahwa *exosome MSC* yang terpapar hipoksia dapat menurunkan kadar MDA dalam sel dan jaringan yang mengalami stres oksidatif. ROS yang termasuk dalam bentuk radikal bebas seperti superoksida (O_2^-) dan hidrogen peroksida (H_2O_2), dapat merusak berbagai komponen intraseluler, termasuk lipid bilayer, protein, dan DNA.⁵⁶ *Exosome* mengandung molekul yang dapat membantu menetralkan ROS atau mengurangi dampak kerusakan yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif ini. *Exosome* mengandung molekul bioaktif seperti enzim antioksidan *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GPX) dan *microRNA* (miRNA) yang membantu

meningkatkan kapasitas antioksidan pada sel penerima. Enzim-enzim ini berfungsi untuk mengubah superoksida menjadi oksigen dan glutathione menjadi bentuk yang lebih mudah diproses, sehingga memperbaiki keseimbangan redoks dalam sel. Dengan demikian *exosome MSC* dapat membantu mengurangi jumlah ROS dalam sel.^{57,58}

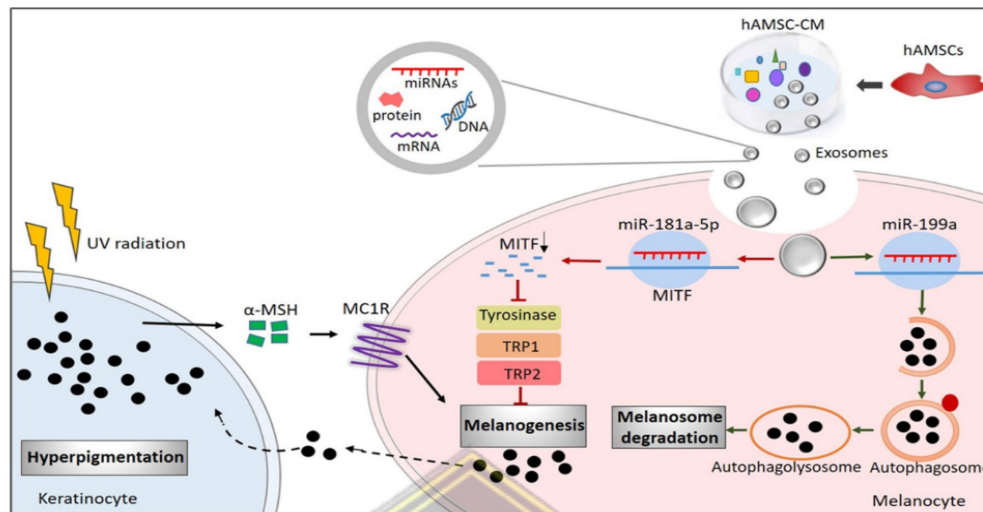
Exosome Mesencymal Stem Cells (EH-MSC) juga mampu meningkatkan aktivitas NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) dalam sel yang terpapar ROS. Aktivasi NRF2 oleh *exosome MSC* ini berkontribusi pada penguatan sistem pertahanan antioksidan sel, yang memungkinkan sel untuk lebih efisien dalam mengatasi ROS. Penurunan aktivitas NRF2 pada model knockdown atau penghambatan NRF2 dapat mengurangi manfaat *exosome MSC* dalam meningkatkan ketahanan sel terhadap stres oksidatif, yang menunjukkan pentingnya jalur NRF2 dalam proses perlindungan seluler ini. NRF2 adalah faktor transkripsi utama yang mengatur respons sel terhadap stres oksidatif. NRF2 mengontrol ekspresi gen-gen yang mengkode enzim antioksidan seperti NQO1 (NAD(P)H dehydrogenase quinone 1) dan HO-1 (heme oxygenase-1), yang membantu mengurangi ROS dan meningkatkan pertahanan sel terhadap kerusakan oksidatif.^{57,58,59}

Exosome juga berperan dalam komunikasi antar sel, di mana mereka membawa molekul seperti miRNA dan mRNA yang mengatur ekspresi gen dalam sel penerima. Beberapa miRNA yang dibawa oleh *exosome* dapat mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam

pertahanan sel terhadap stres oksidatif, mengaktifkan jalur-jalur antioksidan, atau menghambat jalur pensinyalan yang memperburuk kerusakan oksidatif. Sebagai contoh, miRNA tertentu yang terdapat dalam *exosome MSC* dapat menurunkan ekspresi JNK (c-Jun N-terminal kinase) dan p38 MAPK, dua jalur pensinyalan yang sering terlibat dalam peningkatan ROS dan peradangan dalam sel. Dengan menurunkan aktivitas jalur-jalur ini, *exosome MSC* membantu menurunkan kerusakan oksidatif dan meningkatkan kelangsungan hidup sel.^{57,59}

2.5.2. Mekanisme Pengaruh *Exosome* terhadap Melanogenesis

Exosome MSC mengandung miR-181a-5p yang dapat merusak mRNA dari MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) dan menyebabkan tidak terekspresinya gen MITF. Penurunan MITF menyebabkan penghambatan ekspresi protein-protein kunci seperti *tyrosinase* dan TYRP1, yang terlibat dalam sintesis melanin. Dengan demikian, miR-181a-5p menghambat produksi melanin dalam sel-sel melanosit. MiR-199a juga ditemukan dalam *exosome MSC* yang dapat mempengaruhi degradasi melanosom dengan mengaktifkan autofagi. Autofagi adalah proses di mana sel menghilangkan komponen-komponen yang tidak diperlukan atau rusak, termasuk melanosom yang mengandung melanin. MiR-199a dapat memodulasi jalur mTOR, yang merupakan penghambat autofagi, untuk mempromosikan degradasi melanosom, sehingga mengurangi akumulasi melanin di dalam kulit.⁶⁰



Gambar 2.8. Mekanisme *Exosome MSC* dalam menghambat MITF⁶⁰

2.6. Alpha Arbutin

Arbutin adalah senyawa turunan dari hidrokuinon yang secara alami ditemukan dalam berbagai tanaman seperti bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*), cranberry, dan blueberry. Senyawa ini termasuk dalam golongan glikosida fenolik yang berfungsi sebagai agen depigmentasi dengan cara menghambat aktivitas enzim *tyrosinase*, enzim kunci dalam biosintesis melanin.⁶¹ Arbutin tersedia dalam dua bentuk utama, yaitu beta-arbutin dan alpha-arbutin. Alpha-arbutin merupakan isomer yang memiliki struktur *4-hydroxyphenyl-α-glucopyranoside* dan diketahui memiliki efektivitas yang lebih tinggi dibandingkan beta-arbutin dalam menghambat *tyrosinase*.⁶² Dalam dunia kosmetik, alpha-arbutin lebih disukai karena sifatnya yang lebih stabil dan kemampuannya dalam memberikan efek pencerah kulit tanpa menyebabkan iritasi yang signifikan.⁶¹

Hiperpigmentasi adalah kondisi yang disebabkan oleh peningkatan produksi melanin di kulit akibat paparan sinar ultraviolet B (UVB). Paparan UVB

meningkatkan radikal bebas dan inflamasi di kulit, yang mengaktifkan enzim *tyrosinase* di dalam melanosit dan meningkatkan produksi melanin sebagai respons perlindungan terhadap kerusakan sel.⁶³ Arbutin, khususnya alpha-arbutin, berperan dalam menghambat hiperpigmentasi melalui beberapa mekanisme utama:

1. Inhibisi Enzim *Tyrosinase*

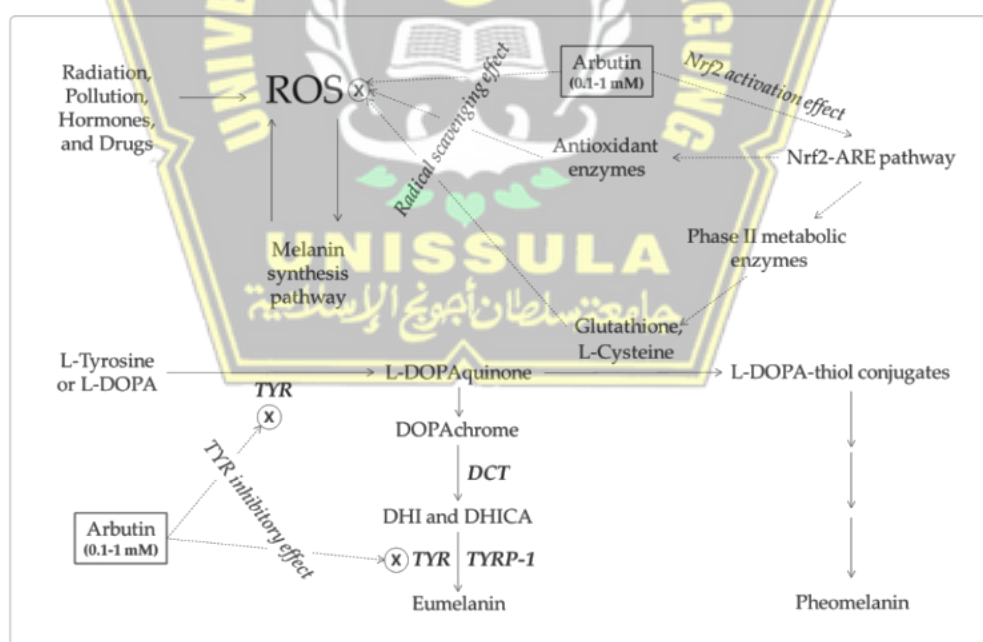
Enzim *tyrosinase* adalah enzim utama dalam jalur biosintesis melanin yang berperan dalam oksidasi tirosin menjadi DOPA (dihidroksifenilalanin) dan selanjutnya menjadi dopaquinone, yang kemudian mengalami reaksi lebih lanjut hingga membentuk melanin. Alpha-arbutin bekerja dengan menghambat aktivitas *tyrosinase* secara kompetitif, sehingga mengurangi produksi melanin dan mencegah terbentuknya noda gelap pada kulit.⁶⁹ Studi menunjukkan bahwa alpha-arbutin memiliki kemampuan menghambat *tyrosinase* 10 kali lebih kuat dibandingkan beta-arbutin, menjadikannya agen pemutih kulit yang lebih efektif.⁶⁵

2. Perlindungan Terhadap Kerusakan Akibat UVB

Alpha-arbutin memiliki efek perlindungan terhadap kerusakan akibat UVB dengan mengurangi ketebalan epidermis, menekan jumlah sel inflamasi, serta menurunkan ekspresi sitokin pro-inflamasi contohnya IL-1 β , IL-6, dan TNF- α .⁶³ Dengan menurunkan kadar sitokin inflamasi ini, alpha-arbutin tidak hanya mencegah peningkatan produksi melanin tetapi juga membantu mengurangi efek penuaan kulit akibat sinar UVB.⁶³

3. Efek Antioksidan dalam Mengurangi Stres Oksidatif

Sinar radiasi ultraviolet B dengan panjang gelombang 280-320 nm dapat diserap oleh kromofor di dalam sel kulit dan menyebabkan kromofor tersebut tereksitasi yang menghasilkan peningkatan radikal bebas dan memicu produksi melanin sebagai respons protektif. Alpha-arbutin memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas, sehingga mengurangi peradangan dan stres oksidatif yang berkontribusi terhadap hiperpigmentasi.⁶³ Selain itu, alpha-arbutin juga meningkatkan ekspresi kolagen tipe I (COL-1) yang berperan dalam menjaga elastisitas dan kesehatan kulit, sehingga berkontribusi pada efek anti-penuaan.⁶³



Gambar 2.9. Peran arbutin dalam menghambat melanogenesis⁶⁶

2.7. Niacinamide

Niacinamide, juga dikenal sebagai nicotinamide merupakan salah satu bentuk vitamin B3 yang mampu untuk larut dalam air dan memiliki peran penting dalam berbagai fungsi metabolisme seluler. Senyawa ini bersama dengan niacin (asam nikotinat) merupakan prekursor dari NAD^+ (*nicotinamide adenine dinucleotide*) dan NADP^+ (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) yang berperan dalam berbagai reaksi redoks, produksi energi seluler dan mekanisme antioksidan.⁶⁷ Dalam dunia dermatologi, niacinamide telah menjadi bahan aktif utama yang banyak dipakai oleh produsen farmasi untuk membuat produk yang digunakan untuk merawat kulit karena sifatnya yang multifungsi, termasuk sebagai antioksidan, anti-inflamasi, dan agen pencerah kulit.⁶⁷

Niacinamide bekerja melalui beberapa mekanisme utama dalam mengatasi hiperpigmentasi akibat UVB:

1. Menghambat Perpindahan Melanosom dari Melanosit ke Keratinosit

Hiperpigmentasi disebabkan oleh peningkatan produksi melanin dalam melanosit yang kemudian dipindahkan ke keratinosit melalui melanosom. Studi menunjukkan bahwa niacinamide tidak menghambat aktivitas *tyrosinase* secara langsung, tetapi efektif dalam mengurangi transfer melanosom ke keratinosit hingga 35–68%, sehingga mengurangi tampilan hiperpigmentasi pada kulit.⁶⁸ Dalam uji klinis pada wanita Jepang, aplikasi niacinamide 5% secara signifikan menurunkan hiperpigmentasi setelah 4 minggu pemakaian.⁶⁸

2. Menekan Inflamasi yang Disebabkan oleh UVB

Sinar UVB tidak hanya meningkatkan produksi melanin tetapi juga memicu ekspresi sitokin peradangan di kulit dengan meningkatkan Interleukin-1 β , Interleukin-6, dan TNF- α . Niacinamide berefek menekan inflamasi dengan cara menekan NF- κ B (Nuclear Factor kappa - light - chain - enhancer of activated B cells) yang merupakan faktor transkripsi dalam regulasi respon imun dan inflamasi.⁶⁷ Dengan menurunkan ekspresi sitokin ini, niacinamide membantu mengurangi peradangan yang berkontribusi terhadap hiperpigmentasi.⁶⁹

3. Antioksidan dan Melindungi DNA dari Kerusakan Akibat UVB

UVB menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan DNA, yang pada akhirnya memicu hiperpigmentasi dan penuaan kulit. Niacinamide bekerja dengan meningkatkan produksi NAD(P)H, yang berperan dalam sistem pertahanan antioksidan seluler.⁶⁷ Selain itu, niacinamide meningkatkan aktivitas enzim perbaikan DNA yang membantu memperbaiki kerusakan DNA akibat sinar UVB.⁷⁰

4. Meningkatkan Produksi Ceramide dan Memperbaiki Fungsi Barrier Kulit

Paparan UVB dapat merusak lapisan pelindung kulit sehingga menyebabkan *transepidermal water loss* (TEWL), yang dapat memperburuk hiperpigmentasi. Niacinamide terbukti dapat meningkatkan produksi ceramide dan lipid epidermis, sehingga memperbaiki fungsi pelindung kulit dan mencegah dampak buruk dari UVB.^{67,68}

5. Meningkatkan Kecerahan Kulit dengan Menghambat Aktivitas MMP
(*Matrix Metalloproteinase*)

Selain menyebabkan hiperpigmentasi, UVB juga meningkatkan ekspresi MMP-1 dan MMP-9, yang berperan dalam degradasi kolagen dan elastin. Studi menunjukkan bahwa niacinamide dapat menghambat ekspresi MMP, sehingga tidak hanya membantu mengurangi hiperpigmentasi tetapi juga mampu mengurangi tanda-tanda penuaan akibat paparan UVB dan niacinamide juga mampu meningkatkan kecerahan kulit.^{67,68}



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Hiperpigmentasi akibat radiasi yang intens dari sinar UVB terjadi ketika kulit memproduksi terlalu banyak melanin sebagai respons terhadap kerusakan akibat sinar matahari. Paparan UVB akan diserap oleh kromofor di kulit seperti NADH yang memiliki pita serapan di daerah uv sekitar 260-360nm. NADH yang menyerap UVB akan mengalami eksitasi elektron ke tingkat yang lebih tinggi dan menghasilkan radikal bebas atau ROS contohnya superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal bebas dengan elektron yang tidak berpasangan tersebut akan mencari pasangan atau menempel pada membran sel yang mengandung asam lemak tak jenuh dan menghasilkan produk sampingan berupa hidroperoksida lipid. Proses ini kemudian melanjutkan reaksi rantai yang menghasilkan MDA, yang merupakan salah satu penanda utama peroksidasi lipid. Paparan ultraviolet B menyebabkan kerusakan DNA dan aktivasi protein faktor transkripsi p53. Protein p53 yang telah aktif memicu transkripsi gen promotor *pro-opiomelanocortin* (POMC) yang kemudian akan dipecah menjadi peptida-peptida kecil, seperti α -, β -, lipotropi, ACTH dan α -MSH. α -MSH, yang berasal dari POMC berikatan dengan MC1R (*Melanocortin 1 Receptor*) pada melanosit, yang memicu peningkatan kadar cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) dalam sel melanosit. Peningkatan cAMP ini mengaktifkan *protein kinase A* (PKA), yang memfosforilasi dan

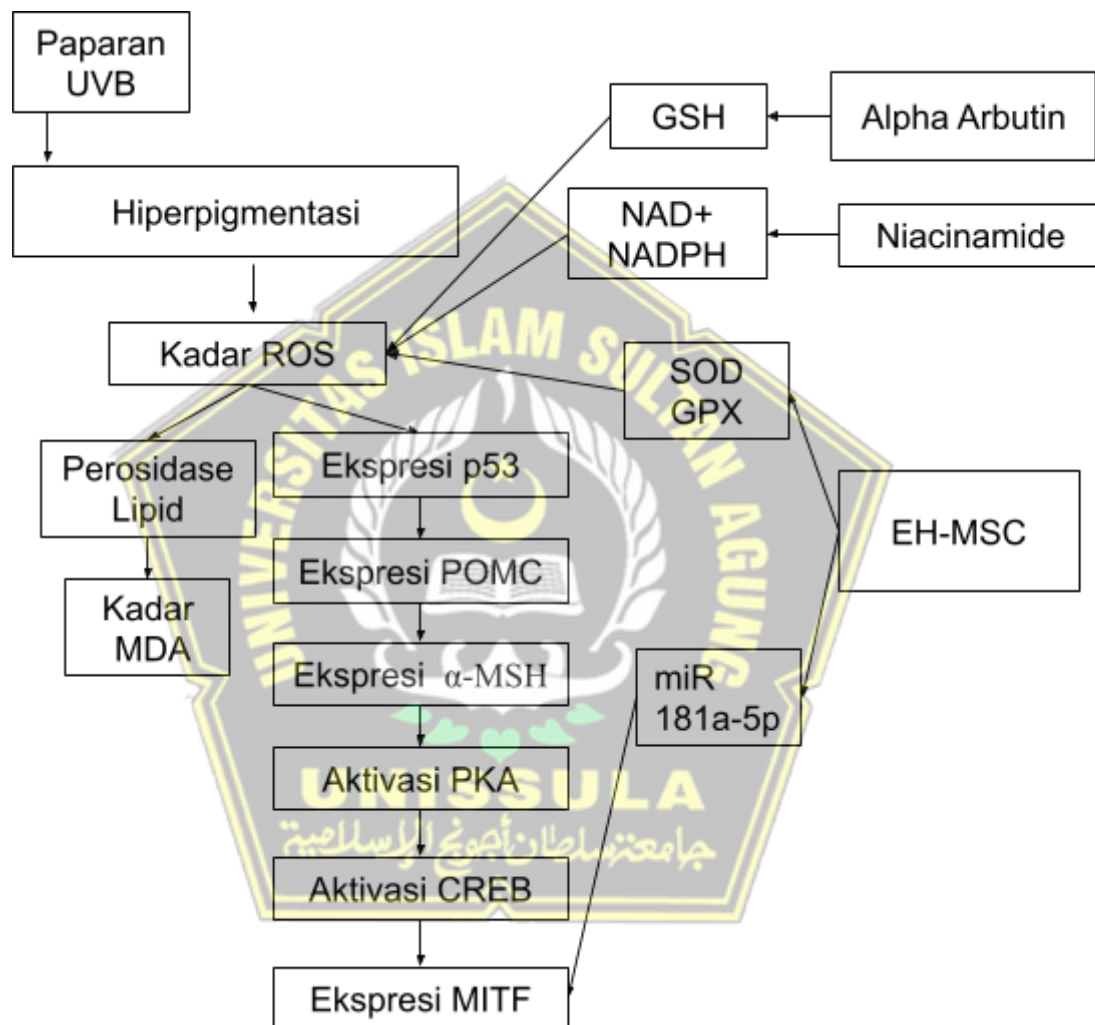
mengaktifkan CREB (*cAMP-response element-binding protein*). Aktivasi CREB kemudian meningkatkan ekspresi MITF, yang berperan penting dalam mengatur ekspresi gen-gen melanogenik seperti *tyrosinase*, TYRP1, dan TYRP2. Gen-gen ini menyebabkan sintesis melanin yang pada akhirnya akan dibawa melanosom menuju keratinosit dan menyebabkan hiperpigmentasi.

Alpha arbutin dewasa ini menjadi alternatif untuk terapi yang efektif untuk gangguan hiperpigmentasi, dan menunjukkan sitotoksitas yang lebih sedikit daripada hidrokuinon. Senyawa ini mencegah melanogenesis dengan menghambat aktivitas tirosinase secara kompetitif dan reversibel tanpa mempengaruhi transkripsi mRNA *tyrosinase*. Alpha-arbutin juga memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas, sehingga mengurangi peradangan dan stres oksidatif yang berkontribusi terhadap hiperpigmentasi.

Niacinamide merupakan prekursor untuk kofaktor *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD) dan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADP). Bersama dengan bentuk tereduksi mereka NADH dan NADPH, enzim-enzim ini berpartisipasi dalam banyak reaksi enzimatik dan juga bertindak sebagai antioksidan. Selain itu, niacinamide mempengaruhi pigmentasi kulit dengan menurunkan regulasi transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit.

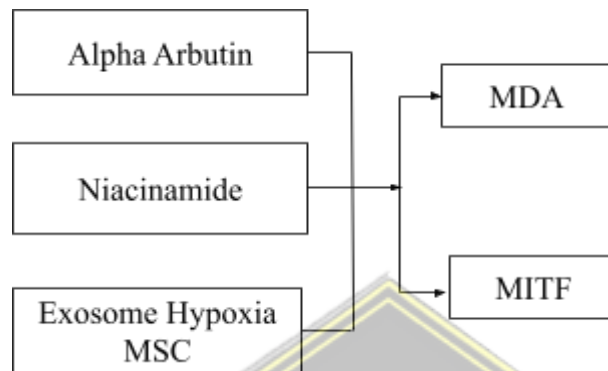
Exosome hypoxia mesenchymal stem cells (MSC) memiliki potensi untuk menekan hiperpigmentasi dengan mengurangi stres oksidatif dan mengganggu pembentukan gen melanogenesis. *Exosome* mengandung molekul bioaktif seperti enzim *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GPX) dan microRNA (miRNA) yang dapat membantu menetralkan ROS dan mengurangi

dampak kerusakan yang disebabkan oleh ROS. *Exosome* juga mengandung mRNA miR-181a-5p yang dapat menurunkan ekspresi MITF.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

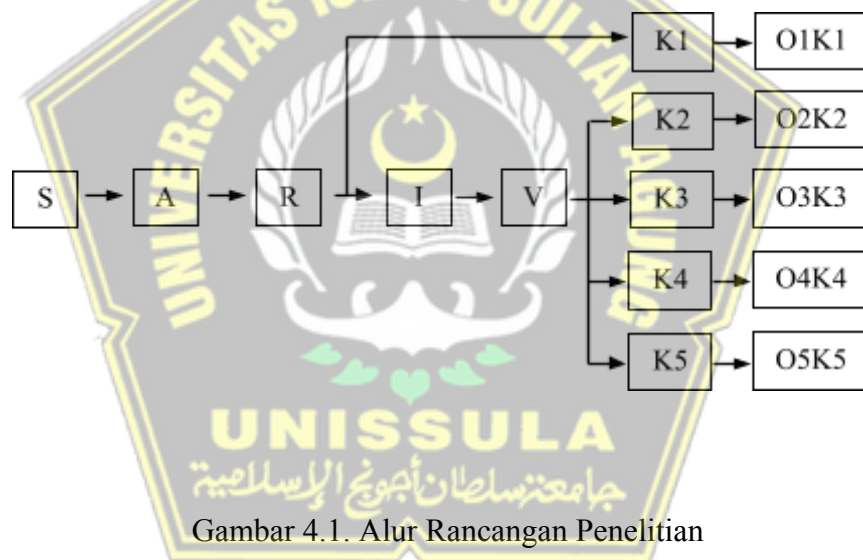
Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* 200 μ l, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap kadar MDA dan ekspresi MITF pada Mencit model C57BL/6 Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan eksperimental in vivo dengan *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Subjek penelitian adalah mencit jantan galur C57BL/6 dengan bobot badan 20-25 gr.



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel

A : Aklimatisasi

R : Randomisasi

I : Induksi UVB

V : Validasi

- K1: Mencit sehat tanpa paparan UVB.
- K2: Kontrol Negatif (Mencit dengan diberi NaCl 0,9%)
- K3: Kontrol Positif (Mencit dengan diberi topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram)
- K4: Perlakuan 1 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi *exosome* 200 μ l).
- K5: Perlakuan 2 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan topikal alpha arbutin 5%, niacinamide 4% masing - masing sebanyak 0,3 gram dan perlakuan injeksi *exosome* 200 μ l)
- O1K1 : Observasi kadar MDA dan ekspresi MITF kelompok K1
- O2K2 : Observasi kadar MDA dan ekspresi MITF kelompok K2
- O3K3 : Observasi kadar MDA dan ekspresi MITF kelompok K3
- O4K4 : Observasi kadar MDA dan ekspresi MITF kelompok K4
- O5K5 : Observasi kadar MDA dan ekspresi MITF kelompok K5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

Injeksi *exosome hypoxia mesenchymal stem cells* 200 μ l dan topikal krim alpha arbutin 5% dengan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram

4.2.1.2. Variabel Terikat

Kadar MDA dan Ekspresi MITF

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. EH-MSK

Cairan hasil isolasi *exosome* dari MSC yang di kultur dalam kondisi hipoksia diberikan secara injeksi subkutan kepada beberapa kelompok yaitu K4 dan K5. Injeksi *exosome* diberikan pada hari ke-1 dan ke-4 perlakuan.

Skala : Rasio

4.2.2.2. Alpha Arbutin dan Niacinamide

Alpha arbutin dan niacinamide adalah terapi *gold* standar berupa sediaan topikal dengan konsentrasi alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terbagi dalam beberapa kelompok yaitu K3 (kontrol positif) dan K5. Alpha arbutin dan niacinamide diberikan pada hari ke-1 sampai 7 perlakuan.

Skala: Rasio

4.2.2.3. Kadar MDA

Kadar MDA adalah rata-rata konsentrasi MDA yang diambil dari jaringan kulit mencit C57BL/6 pada penelitian. MDA dianalisis menggunakan ELISA pada hari ke-7 setelah perlakuan.

Skala: Rasio

4.2.2.4. Ekspresi MITF

Ekspresi MITF adalah rata-rata konsentrasi MITF yang diperiksa dari jaringan kulit mencit C57BL/6 pada penelitian. MITF diperiksa

pada hari ke-7 setelah dilakukan perlakuan dan dianalisis menggunakan qRT-PCR.

Skala: Rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Mencit jantan galur C57BL/6 dengan usia 2-3 bulan yang mempunyai bobot 20-25 gram yang dipastikan dalam kondisi sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh *Animal Model Research Center SCCR* Indonesia.

4.3.2. Sampel Penelitian

Mencit C57BL/6 yang diberi paparan UVB 180mJ/cm² selama 2 minggu.

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

- a. Mencit jantan galur C57BL/6.
- b. Umur 2-3 bulan (dewasa muda, fase stabil).
- c. Berat badan 20-25 gram.
- d. Mencit sehat secara klinis, aktif dan tidak ada luka atau kelainan kulit.
- e. Tidak sedang terinfeksi atau menunjukkan gejala penyakit (mata berair, bulu rontok, lesu).
- f. Adaptasi minimal 5 hari sebelum intervensi.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

- a. Mencit dengan luka kulit pada saat adaptasi sebelum perlakuan.
- b. Mencit dengan tanda penyakit/ infeksi respirasi, kulit, atau stres berat saat adaptasi.
- c. Mencit yang tidak terjadi hiperpigmentasi setelah paparan UVB.

4.3.2.3. Kriteria Drop Out

- a. Mencit yang mati atau infeksi selama penelitian.
- b. Mencit yang mengalami perubahan berat badan pada masa penelitian >20% dari bobot awal.
- c. Stress berat atau perilaku abnormal saat penelitian.
- d. Mencit yang mendapatkan perlakuan pemberian dosis yang salah.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan cara *Randomized Sampling*. Mencit jantan galur C57BL/6 dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok 1 mencit sehat tanpa paparan UVB, kelompok 2 kontrol negatif mencit yang diberi induksi penyinaran UVB, kelompok 3 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan topikal alpha arbutin 5% dengan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram, kelompok 4 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi *exosome* 200µl, kelompok 5 perlakuan mencit dengan paparan UVB dan perlakuan topikal alpha arbutin 5% dengan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram dan perlakuan injeksi *exosome* 200µl.

4.3.4. Jumlah Sampel

Jumlah sampel pada penelitian eksperimental ini dihitung menggunakan

Rumus Federer. Rumus Federer yaitu:

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

Berdasarkan perhitungan rumus tersebut diperoleh hasil n adalah 5.

Keterangan:

t = banyaknya kelompok yaitu 5

n = banyaknya sampel setiap perlakuan

Sampel menjadi 5 ekor per kelompok yang diambil secara acak.

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok, maka jumlah mencit C57BL/6

yang dibutuhkan adalah 25 ekor mencit ditambah untuk cadangan 5 ekor

dan ditambah jumlah mencit untuk validasi kelompok sehat dan sakit

yaitu 4ekor. Sehingga total mencit yang dibutuhkan adalah 34 ekor.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan sebagai berikut :

- a. UV chamber.
- b. Kandang pemeliharaan mencit.
- c. *Flowcytometer*.
- d. Mikroskop.
- e. Clipper.
- f. Pinset jaringan.
- g. Gunting jaringan

- h. Spuit 1cc, Needle 30g.
- i. Timbangan digital.
- j. Spatula.

4.4.2. Bahan

Bahan yang dipakai dalam penelitian yaitu sebagai berikut :

- a. NACL 0,9%.
- b. Krim alpha arbutin 5%
- c. Krim Niacinamide 4%.
- d. *Exosome Hypoxia Mesenchimal Stem Cells* dosis 200 µl.
- e. Pakan mencit.
- f. Zat pewarnaan *Masson Fontana*.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

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

4.5.2. *Exosome Hypoxia MSCs*

Sediaan EH-MSCs diperoleh dari SCCR dan sudah melalui proses validasi MSCs dan *Exosome*.

4.5.3. Paparan UV-B

- a. Mencit C57BL/6 diadaptasikan selama 5 hari
- b. Rambut pada bagian punggung mencit dicukur dengan *clipper* hingga bersih

- c. Punggung mencit yang telah dicukur seluas 5x5 cm disinari dengan UVB di dalam UV chamber dengan 180 mJ/cm² dengan pengulangan 3 kali dalam seminggu (hari 1, 3, dan 5) 10 menit selama dua minggu.
- 4.5.4. Mencit K2 diberikan NaCl 0,9%, mencit K3 diberikan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram selama 7 hari, mencit K4 diberikan injeksi *exosome* 2x di hari ke-1 dan di hari ke-4 dengan dosis 200 µl, mencit K5 diberikan injeksi *exosome* 2x di hari ke-20 dan di hari ke-23 dengan dosis 200 µl dan diberikan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram selama 7 hari.
- 4.5.5. Terminasi Mencit dan Pengambilan Jaringan
- Terminasi mencit dengan cara dislokasi servikalis.
 - Mencit yang telah mati diambil organ kulitnya dengan gunting jaringan lalu disimpan di dalam *cryotube* pada suhu -80°C dalam RNA later.
- 4.5.6. Prosedur Pembuatan Preparat dan Pembacaan Hiperpigmentasi
- Sampel kulit mencit yang sudah diambil kemudian difiksasi dengan formalin 10 % untuk dibuat menjadi blok parafin.
 - Sampel diwarnai dengan *masson-fontana staining*.
 - Ketebalan setiap bagian epidermis dari lapisan basal ke stratum korneum diukur dengan menggunakan mikroskop.
 - Ketebalan setiap bagian ditentukan dengan *imageJ software*.
 - Hasil pengukuran kemudian dibandingkan dengan kontrol dan mencit sehat.

4.5.7. Pengukuran Kadar MDA dengan ELISA

Malondialdehid (MDA) diukur dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dengan kit komersial yang spesifik untuk MDA. Prinsip dasar pemeriksaan ini adalah adanya reaksi spesifik antara antigen MDA yang terdapat dalam sampel dengan antibodi yang dilapisi pada sumur mikrotiter. Antibodi tersebut kemudian dideteksi menggunakan antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim, sehingga penambahan substrat menghasilkan perubahan warna yang sebanding dengan konsentrasi MDA dalam sampel.

Proses analisis meliputi tahap persiapan standar, blanko, kontrol, dan sampel penelitian, kemudian dilakukan inkubasi sesuai prosedur pabrikan untuk memungkinkan ikatan antigen-antibodi. Setelah tahap pencucian untuk menghilangkan ikatan non-spesifik, ditambahkan antibodi deteksi yang berkonjugasi enzim, diikuti dengan penambahan substrat kromogenik. Reaksi enzim-substrat menghasilkan perubahan warna yang intensitasnya diukur menggunakan microplate reader pada panjang gelombang tertentu sesuai petunjuk kit.

Konsentrasi MDA dalam sampel dihitung dengan menginterpolasi nilai absorbansi rata-rata terhadap kurva standar yang diperoleh dari seri pengenceran standar MDA yang disediakan oleh kit. Hasil kemudian dinyatakan dalam satuan nmol/mg protein setelah dilakukan normalisasi terhadap kadar protein total jaringan/hewan uji. Seluruh sampel diperiksa minimal dalam duplikat untuk meningkatkan reliabilitas data.

4.5.8. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA

- a. Kulit mencit C57BL/6 difiksasi di formalin 10 % dan dibuat menjadi blok parafin.
- b. Sampel sebanyak 100 mg diambil dari RNA later lalu dipotong menjadi kecil-kecil dimasukkan ke dalam tube yang telah terisi 50 ml RNA Iso Plus.
- c. Kulit yang sudah dipotong dihaluskan dengan *micopastle* dan dicampur lagi dengan RNA Iso Plus 50 ml kemudian disimpan dengan suhu ruang selama 5 menit.
- d. *Chloroform* 20 ml ditambahkan lalu dilarutkan dengan bantuan vortex hingga larutan menjadi warna putih susu.
- e. Sampel didiamkan dalam suhu ruang selama 2-3 menit, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C sampai terbentuk 3 lapisan. Lapisan yang teratas berupa RNA (*fase liquid*), lapisan kedua adalah DNA (*fase semisolid*) dan lapisan yang paling bawah mengandung debris sel.
- f. Lapisan yang paling atas kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge baru, diukur volumenya kemudian ditambahkan *isopropanolol* dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
- g. Tabung *Eppendorf* digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm dalam waktu 10 menit pada suhu 40°C. Supernatan yang terbentuk di

- permukaan tabung dibuang hingga terlihat pellet berwarna putih di dasar tabung.
- h. Pellet tersebut ditunggu hingga kering lalu tambahkan 100 ml etanol 70 % dalam larutan DEPC lalu bolak balikkan berulang kali dilanjutkan dengan sentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40°C.
 - i. Supernatan yang terbentuk dibuang kemudian tambahkan DEPC sebanyak 30-50 μ m dicampur pada suhu 55°C selama 10 menit. Total RNA *solution* diperoleh dan disimpan pada suhu -80°C kemudian dikuantifikasi dengan nanodrop. Hasil tersebut kemudian dikuantifikasi dan dijadikan 3000 ng.
 - j. Sintesis cDNA dibuat dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 μ l oligoDT dan PCR water hingga mencapai volume 10 μ l, kemudian diinkubasi dalam suhu 70°C selama 5 menit. Campuran tersebut disebut campuran A.
 - l. Campuran B dibuat dari 5 X buffer 4 μ l, DEPC-Treated H₂O 5 μ l, revertraAce 1 μ l dan campurkan dengan campuran A lalu inkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit dilanjut 42°C selama 50 menit dan 85°C selama 5 menit.

4.5.9. Prosedur Pembacaan Ekspresi MITF dengan *Real Time*-vPolymerase Chain Reaction (RT-PCR)

- a. Ekspresi mRNA dari Gen MITF dianalisis menggunakan RT-PCR. Campuran dari 3 μ l cDNA sampel, *Taq master mix* (dNTPs, *Taq*

DNA polymerase, reaction buffer dan $MgCl_2$) sebanyak 12,5 μ l, primer yang spesifik pada Gen MITF target sebanyak 0,6 μ l primer *forward (Mitf): GATCGACCTCTACAGCAACCAG, reverse (Mitf): GCTCTTGCTTCAGACTCTGTGG.*

- b. Gen *housekeeping* GAPDH digunakan sebagai *baseline* dengan primer *forward* 5'-GAAGGTGAAGGTCGAGTC-3' dan *reverse* 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'. PCR dianalisis menggunakan qRT-PCR illumina.
- e. Peningkatan ekspresi gen dianalisis dengan menggunakan *software EcoStudy*.

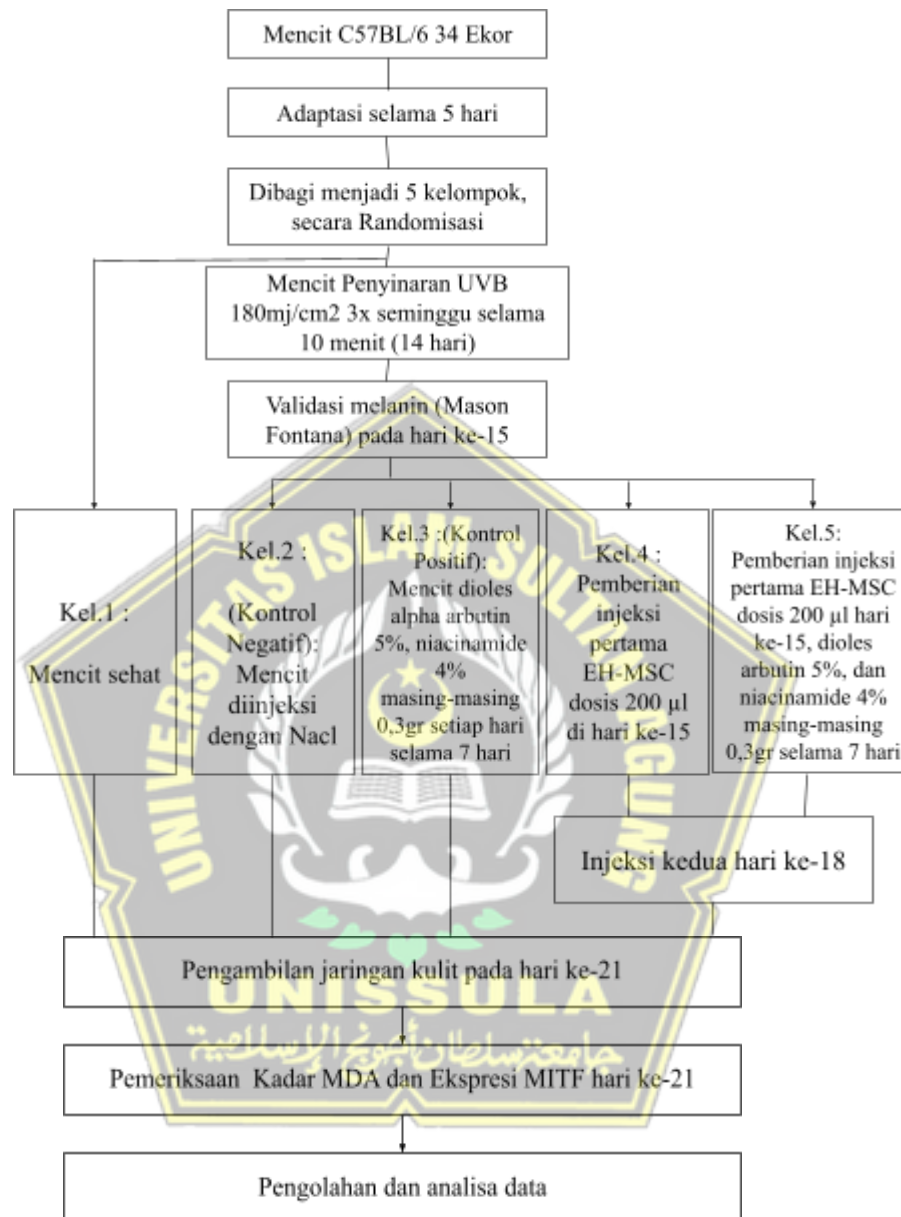
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Bulan Mei 2025 di laboratorium *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia.

4.7. Analisa Data

Analisis normalitas data Kadar MDA dan ekspresi MITF menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dikarenakan jumlah sampel kurang dari 50 dengan hasil menunjukkan data berdistribusi normal ($p > 0,05$). Analisis homogenitas dari data menggunakan uji *Levene's Test* dengan hasil menunjukkan data yang didapat tidak homogen ($p < 0,05$), sehingga peneliti menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kadar MDA dan ekspresi MITF. Uji data dengan *Post Hoc Tamhane* digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan ada perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

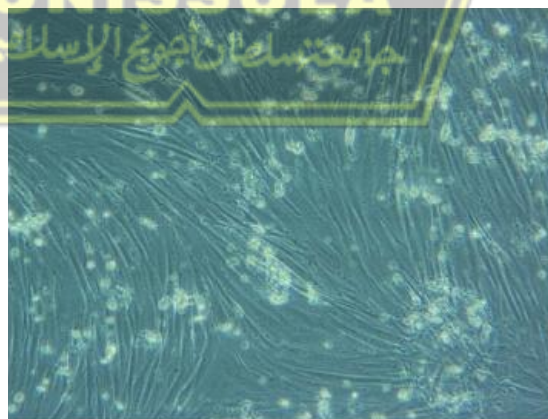
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

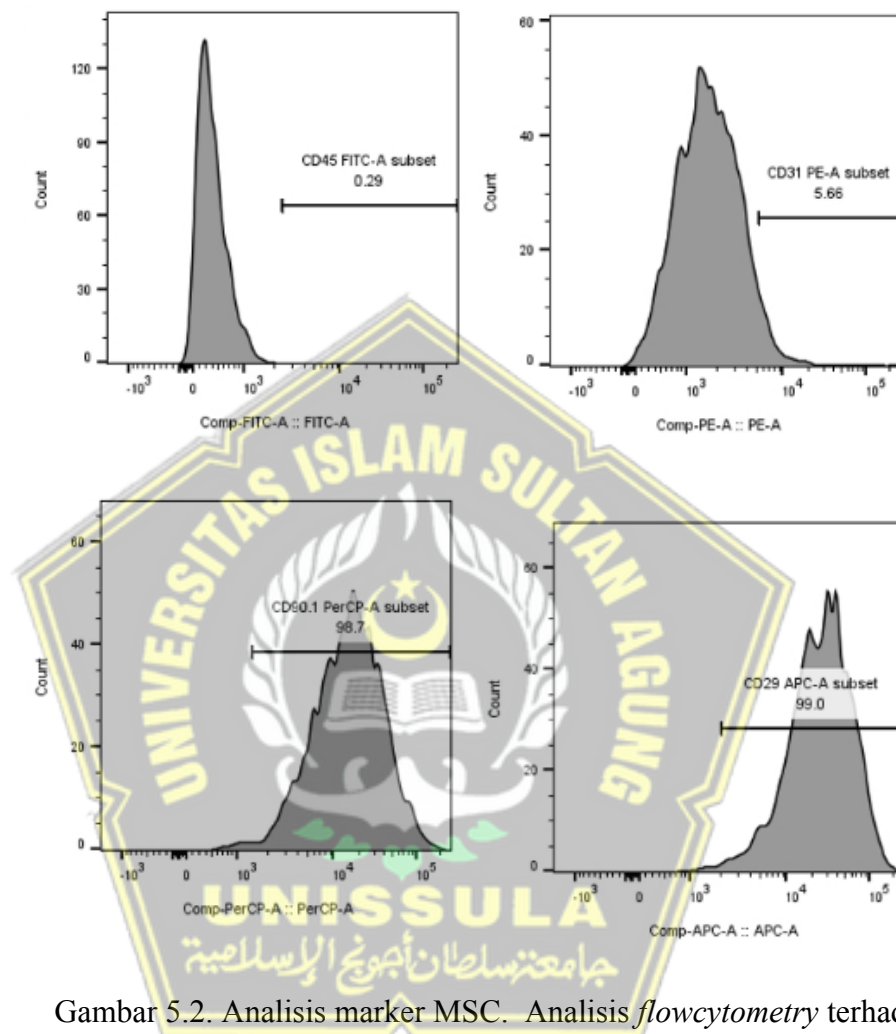
5.1.1. Hasil Validasi EH-MSC (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*)

Mesenchymal stem cell bersumber dari tali pusat mencit pada usia 21 hari kehamilan. Jaringan tali pusat mencit tersebut di isolasi dengan larutan PBS di Laboratorium SCCR Semarang. Sel yang telah di isolasi tersebut kemudian dikultur di dalam *plate kultur* yang berisi media DMEM dan di inkubasi pada suhu 37°C. *Mesenchymal Stem Cells* dilihat dibawah mikroskop menunjukkan bahwa sel-sel mengalami adhesi atau menempel pada dasar *flask* atau *plate kultur* dengan gambaran morfologi *fibroblas like cell* atau *spindle-like cell* (Gambar 5.1)



Gambar 5.1. Morfologi MSC

Morfologi MSC berbentuk *spindle-like cell*



Gambar 5.2. Analisis marker MSC. Analisis *flowcytometry* terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90 dan CD29

Analisis *flowcytometry* dilakukan untuk mengidentifikasi penanda permukaan sel pada MSC hasil kultur. Hasil analisis *flowcytometry* menunjukkan bahwa sel yang dikultur mengekspresikan CD45 sebesar 0,29% artinya ekspresi sangat rendah dan menunjukkan hampir tidak ada sel hematopoietik. Begitu juga dengan CD31 sebesar 5,66% yang berarti ekspresi sangat rendah menandakan sebagian kecil

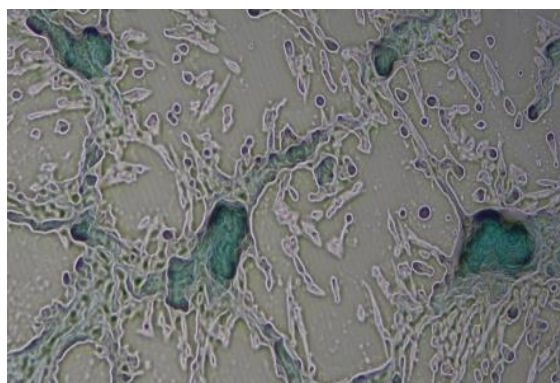
sel dengan sifat endotelial. Sebaliknya, MSC secara kuat mengekspresikan CD90 (98,7%) dan CD29 (99,0%), dimana keduanya merupakan marker khas MSC (Gambar 5.2). Hal ini menunjukkan bahwa sel yang dikultur dari tali pusat memiliki karakteristik MSC.

Mesenchymal stem cells memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai macam jenis sel seperti sel osteogenik dan sel kondrosit yaitu dengan cara memberi medium spesifik yang menginduksi diferensiasi, baik menjadi osteogenik atau kondrosit. Penelitian ini menggunakan pewarnaan *Alizarin-red staining* untuk melihat diferensiasi osteoblas dan *Alician Blue Staining* untuk melihat diferensiasi kondrosit. (Gambar 5.3. A dan B).

A

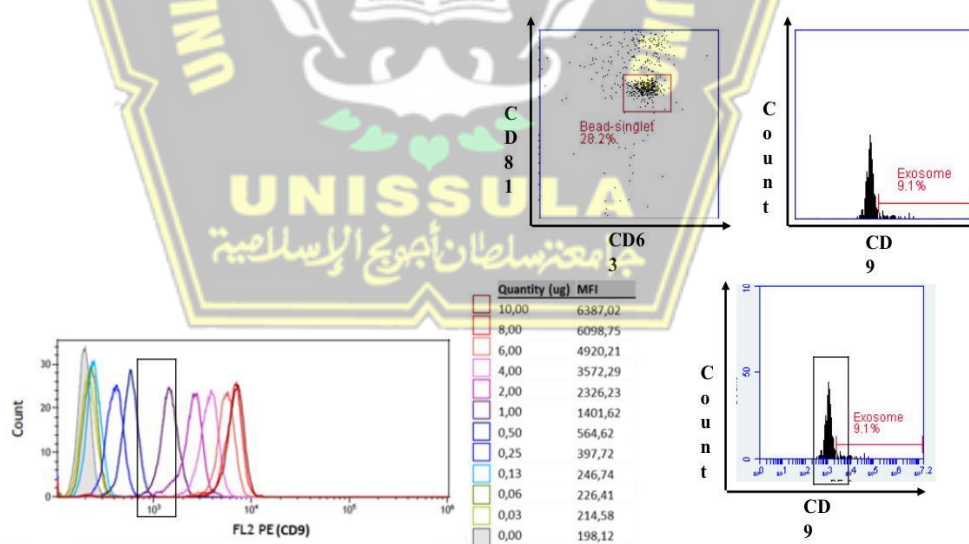


B



(A) Kemampuan differensiasi MSCs menjadi osteogenik pada pewarna *Alizarin-red staining* (perbesaran 200x). (B) kondrosit pada pewarnaan *Alician Blue Staining* (perbesaran 100x).

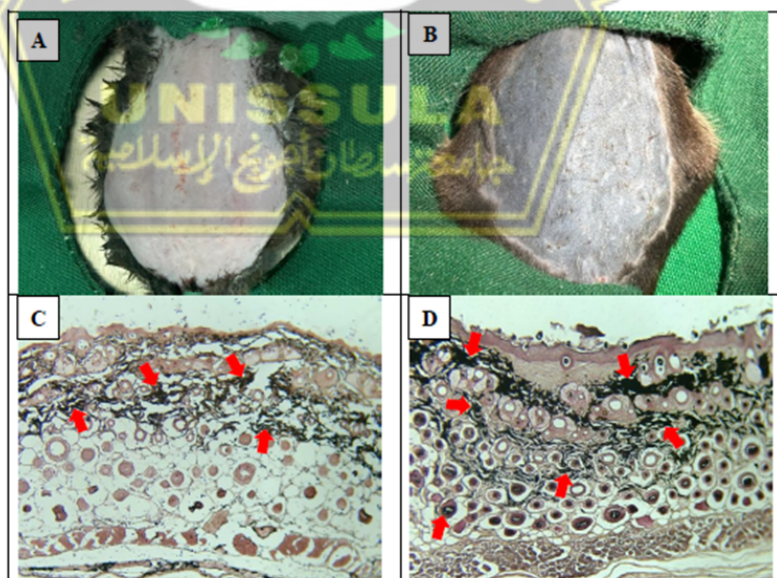
Mesenchymal Stem Cells yang sudah tervalidasi diinkubasi di dalam kondisi rendah oksigen atau hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam. Sekretom MSC dikumpulkan dan dilakukan filtrasi dengan metode TFF dengan ukuran 100-500 kDa sampai diperoleh EH-MSC. Kadar *exosome* dianalisis menggunakan metode *flowcytometry* dan didapatkan bahwa kadar *exosome* yang didapatkan sebesar 0.75 ug/100 uL = 7.5 ug/mL (Gambar 5.4).



Gambar 5.4. Hasil Validasi *Exosome*

5.1.2. Hasil Validasi Hiperpigmentasi

Validasi pembentukan model Hiperpigmentasi pada mencit C57BL/6 dilakukan secara visual dengan membandingkan kondisi kulit pada tikus sehat dan tikus yang diinduksi UVB. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa jaringan kulit pada mencit sehat tampak berwarna merah muda pucat tanpa tanda-tanda hiperpigmentasi, menunjukkan integritas epidermis yang masih utuh dan tidak adanya stimulasi melanogenesis. Sedangkan mencit yang diinduksi UVB menunjukkan peningkatan pigmentasi kulit dengan pewarnaan lebih gelap yang menyebar merata di area perlakuan, mengindikasikan peningkatan deposisi melanin sebagai respons adaptif terhadap paparan sinar UVB, sebagaimana terlihat dalam Gambar 5.5.



Gambar 5.5. Validasi Hiperpigmentasi jaringan kulit mencit C57BL/6

Gambar (A) Makroskopis jaringan kulit mencit C57BL/6 sehat, (B) makroskopis jaringan kulit mencit C57BL/6 setelah dipapar UVB, (C) gambaran mikroskopis jaringan kulit mencit C57BL/6 sehat dengan pewarnaan masson fontana dan dilihat dengan pembesaran 400x, (D) gambaran mikroskopis jaringan kulit mencit C57BL/6 yang terpapar UVB dengan pewarnaan masson fontana dan dilihat dengan pembesaran 400x.

Setelah mencit tervalidasi mengalami hiperpigmentasi, mencit yang tanpa induksi UVB digunakan sebagai kontrol sehat (K1), sedangkan mencit yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi UVB dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara acak yaitu K2 (mencit hiperpigmentasi diberi NaCl 0,9%), K3 (diberi topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram selama 7 hari), K4 (mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi EH- MSC dosis 200 µl di hari ke-20 dan 23) dan K5 (mencit dengan paparan UVB dengan perlakuan kombinasi injeksi EH- MSC dosis 200 µl di hari ke-20 dan 23, topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% selama 7 hari).

Setelah pemberian perlakuan selama 7 hari, pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-27. Jaringan kulit kemudian dihomogenisasi menggunakan RIPA *buffer* yang telah ditambahkan *inhibitor proteinase* untuk menghambat kerusakan protein. Setelah jaringan terhomogenisasi menjadi suspensi, proses sentrifugasi

dilakukan, dan supernatan dikumpulkan untuk analisis kadar MDA dengan ELISA dan Ekspresi MITF menggunakan metode qRT-PCR.

5.1.3. Hasil Pemeriksaan Kadar MDA

Berdasarkan Tabel 5.1, rerata kadar MDA tertinggi ditemukan pada kelompok K2 kontrol negatif $355,74 \pm 1,770 \mu\text{g/mL}$, diikuti oleh K1 mencit sehat $287,56 \pm 4,541 \mu\text{g/mL}$ dan K3 kontrol positif; $284,23 \pm 2,716 \mu\text{g/mL}$. Rerata kadar MDA terendah terdapat pada kelompok K5 perlakuan kombinasi topikal alpha arbutin 5%, niacinamide 4%, dan injeksi exosome; $163,62 \pm 1,769 \mu\text{g/mL}$, diikuti oleh K4 perlakuan injeksi exosome; $185,12 \pm 2,503 \mu\text{g/mL}$.

Tabel 5.1. Hasil analisis deskriptif rerata kadar MDA, normalitas, homogenitas dan uji *One Way Anova*

	K1	K2	K3	K4	K5	p
Mean	287.56	355.74	284.23	185.12	163.62	
$\pm$ SD	± 4.541	± 1.770	± 2.716	± 2.504	± 1.769	
<i>Saphiro wilk</i>	0.223*	0.417*	0.559*	0,542*	0,498*	
<i>Levene's Test</i>						0,038
<i>One Way Anova</i>						0,000*

Keterangan: *Shapiro-Wilk* = Normal ($p > 0,05$)
Levene Test = Homogen ($p > 0,05$)
One Way Anova = Signifikan ($p < 0,05$)

Berdasarkan tabel 5.1 analisis distribusi data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa distribusi data pada setiap kelompok adalah normal ($p > 0,05$). Selanjutnya, uji homogenitas varian menggunakan *Levene's test* mengonfirmasi bahwa data kadar MDA pada

kelima kelompok memiliki varians yang tidak homogen $p = 0,038$ ($p < 0,05$).

Analisis perbedaan kadar MDA antar semua kelompok dilakukan menggunakan *One-Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar semua kelompok ($p = 0,000$), perlakuan atau kondisi pada setiap kelompok memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar MDA.

Berdasarkan data kadar MDA yang memiliki perbedaan yang signifikan setelah uji parametrik *One Way ANOVA*, selanjutnya untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji *Post Hoc Tamhane*, karena data bersifat normal dan tidak homogen. Data hasil uji *Post Hoc Tamhane* tersebut ditampilkan dalam tabel 5.2 berikut:

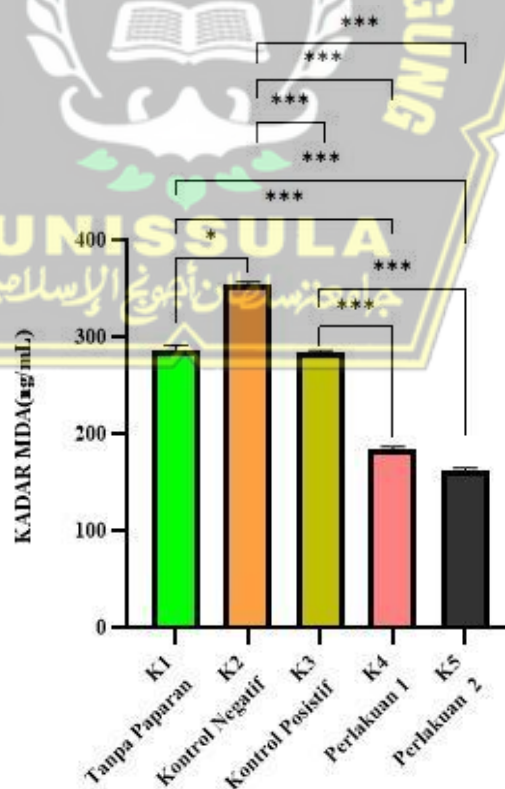
Tabel 5.2. Uji *Post Hoc Tamhane* pada kadar MDA

Kelompok	Kelompok Perbandingan	$p(\text{value})$
K1	K2	0.000
	K3	0.826
	K4	0.000
	K5	0.000
K2	K3	0.000
	K4	0.000
	K5	0,000
K3	K4	0.000
	K5	0.000
K4	K5	0.000

Keterangan : berbeda bermakna $p < 0,05$

Uji *Post Hoc Tamhane* menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok K1 (mencit sehat tanpa paparan UVB) berbeda bermakna dibandingkan dengan K2, K4, dan K5 ($p = 0,000$), namun tidak berbeda

signifikan dengan K3 ($p = 0,826$). Kelompok K2 (kontrol negatif) memiliki kadar MDA yang berbeda bermakna dengan seluruh kelompok lainnya ($p = 0,000$), yang menunjukkan bahwa paparan UVB tanpa perlakuan menyebabkan peningkatan kadar MDA secara signifikan. Kelompok K3 (kontrol positif) juga berbeda bermakna dengan K4 dan K5 ($p = 0,000$), menandakan adanya efek perlakuan terhadap penurunan MDA. Selain itu, perbandingan antara K4 dan K5 menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p = 0,000$), yang mengindikasikan bahwa kombinasi perlakuan topikal alpha arbutin 5%, niacinamide 4%, dan injeksi EH-MSK lebih efektif menurunkan kadar MDA dibandingkan perlakuan injeksi EH-MSK tunggal.



Gambar 5.6. Grafik Kadar MDA(µg/mL)

Gambar 5.6 menunjukkan kadar MDA tertinggi pada kontrol negatif (K2) dan terendah pada perlakuan kombinasi (K5). Paparan UVB tanpa perlakuan meningkatkan kadar MDA secara signifikan. Sedangkan kelompok perlakuan, terutama kombinasi topikal dan injeksi EH-MSC dapat efektif menurunkan kadar MDA.

5.1.4. Hasil Pemeriksaan Ekspresi MITF

Berdasarkan Tabel 5.3. rerata ekspresi MITF tertinggi terdapat pada kelompok K2 kontrol negatif sebesar $1,054 \pm 0,148$, diikuti K1 mencit sehat tanpa paparan UVB sebesar $1,001 \pm 0,004$. Rerata terendah ditemukan pada K4 perlakuan injeksi exosome sebesar $0,767 \pm 0,143$, disusul K5 perlakuan kombinasi sebesar $0,793 \pm 0,102$ dan K3 kontrol positif sebesar $0,785 \pm 0,216$.

Tabel 5.3. Hasil analisis deskriptif rerata ekspresi MITF, normalitas, homogenitas dan uji *One Way Anova*

	K1	K2	K3	K4	K5	p
Mean	1,001	1,054	0,785	0,767	0,793	
±SD	± 0,004	± 0,148	±0,216	±0,143	±0,102	
<i>Saphiro wilk</i>	0,753*	0,276*	0,238*	0,970*	0,316*	
<i>Levene's Test</i>						0,049
<i>One Way Anova</i>						0,002*

Keterangan: *Shapiro-Wilk* = Normal ($p > 0,05$)
Levene Test = Homogen ($p > 0,05$)
One Way Anova = Signifikan ($p < 0,05$)

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan seluruh kelompok memiliki distribusi data normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas *Levene's Test* memberikan nilai $p = 0,049$, yang berarti varians data antar kelompok tidak homogen ($p < 0,05$). Hasil *One Way ANOVA* menunjukkan

perbedaan bermakna antar kelompok ($p=0,002$), yang mengindikasikan bahwa perlakuan yang diberikan berpengaruh signifikan terhadap ekspresi MITF antar kelompok perlakuan.

Selanjutnya untuk mengevaluasi hubungan antar dua kelompok, dilakukan uji *Post Hoc Tamhane*, karena data bersifat normal dan tidak homogen. Data hasil uji *Post Hoc Tamhane* tersebut ditampilkan dalam tabel 5.4.

Tabel 5.4. Uji *Post Hoc Tamhane* pada ekspresi MITF

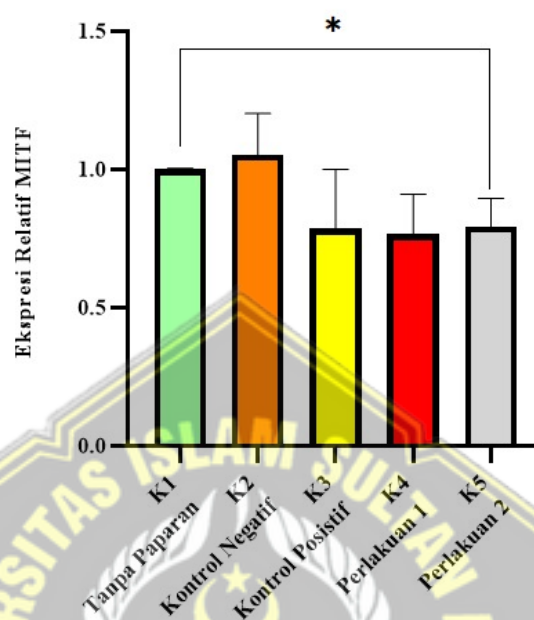
Kelompok	Kelompok Perbandingan	<i>p</i> (value)
K1	K2	0.996
	K3	0.450
	K4	0.099
	K5	0.041
K2	K3	0.289
	K4	0.066
	K5	0,064
K3	K4	1.000
	K5	1.000
K4	K5	1.000

Keterangan: berbeda bermakna $p < 0,05$

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Tamhane* pada ekspresi MITF, sebagian besar perbandingan antar kelompok menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik ($p > 0,05$). Perbedaan signifikan hanya terlihat antara kelompok K1 mencit sehat tanpa paparan UVB dan K5 perlakuan kombinasi topikal alpha arbutin 5%, niacinamide 4%, dan injeksi EH-MSC dengan nilai $p = 0,041$.

Hal ini menunjukkan bahwa penurunan ekspresi MITF pada K5 berbeda signifikan dibandingkan kondisi normal tanpa paparan UVB,

sedangkan kelompok perlakuan lainnya tidak menunjukkan perbedaan bermakna.



Gambar 5.7. Grafik Ekspresi Relatif MITF

Gambar 5.7 menunjukkan bahwa ekspresi relatif MITF pada kelompok kontrol negatif (K2) cenderung lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan, sedangkan nilai terendah terdapat pada kelompok perlakuan injeksi EH-MSC (K4). Hasil perbandingan menunjukkan perbedaan bermakna hanya antara kelompok tanpa paparan (K1) dan perlakuan kombinasi (K5), sedangkan perbandingan antar kelompok lainnya tidak berbeda signifikan.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini, pemberian EH-MSC dosis 200 μ l, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi bertujuan untuk mengevaluasi efeknya terhadap kadar MDA dan ekspresi MITF serta

hubungan kedua parameter ini dengan menurunkan stres oksidatif dan menghambat jalur melanogenesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan analisa statistik pemberian EH-MSC dosis 200 µl, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan namun ekspresi MITF tidak signifikan antara K3, K4 dan K5.

Malondialdehyde (MDA) merupakan hasil dari peroksidase lipid yang merupakan biomarker penting untuk menilai tingkat stres oksidatif pada jaringan kulit yang mengalami kerusakan atau peradangan akibat hiperpigmentasi, terutama yang disebabkan oleh paparan sinar *ultraviolet* (UV). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (K2) yang mengalami hiperpigmentasi tanpa perlakuan memiliki kadar MDA tertinggi yang signifikan dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan stres oksidatif akibat akumulasi radikal bebas di area kulit yang terpapar.^{41,46}

Pemberian EH-MSC (*Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cell*) dengan dosis 200 µl secara signifikan menurunkan kadar MDA dibandingkan kelompok K3 yang diberikan terapi gold standar yaitu alpha arbutin dan niacinamide. Penurunan ini semakin besar pada kelompok yang diberikan kombinasi EH-MSC, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% (K5). Kombinasi ini memiliki efek sinergis dalam menurunkan stres oksidatif. EH-MSC bekerja dengan melepaskan *exosome* yang mengandung molekul bioaktif seperti enzim antioksidan *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GPX) dan *microRNA* (miRNA) yang dapat membantu menetralkan ROS dan mengurangi dampak kerusakan yang disebabkan oleh ROS.⁵⁷⁻⁶⁰

Alpha arbutin merupakan senyawa turunan *hydroquinon* yang bekerja menghambat aktivitas enzim *tyrosinase* dan memiliki aktivitas antioksidan melalui aktivasi dari Nrf2 yang berikatan dengan *Antioxidant Response Element* (ARE) untuk meningkatkan ekspresi gen sintesis glutation (GSH).⁶¹⁻⁶⁵ Niacinamide, yang merupakan bentuk aktif vitamin B3, bekerja memperbaiki barrier kulit, menghambat transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit, serta memiliki efek antioksidan melalui peningkatan NADPH dan penurunan ROS.⁶⁷⁻⁷⁰

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) adalah faktor transkripsi utama dalam proses melanogenesis yang mengatur ekspresi enzim *tyrosinase*, TYRP-1, dan TYRP-2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok K5 yang diberi kombinasi EH-MSC, alpha arbutin, dan niacinamide memiliki ekspresi MITF yang secara signifikan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif (K2). Ekspresi MITF dipengaruhi oleh sinyal oksidatif seperti ROS dan jalur pensinyalan MAPK/ERK. Ketika terjadi peningkatan ROS, jalur pensinyalan yang mengarah ke aktivasi MITF akan meningkat. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* mengandung miR-181a-5p yang dapat mengganggu transkripsi dari gen MITF. Penurunan MITF menyebabkan penghambatan ekspresi protein-protein kunci seperti *tyrosinase* dan TYRP1 yang terlibat dalam sintesis melanin. Dengan demikian, miR-181a-5p menghambat produksi melanin dalam sel-sel melanosit.⁶⁰ Alpha arbutin dalam kombinasi berperan menghambat *tyrosinase* yang merupakan hasil dari faktor transkripsi MITF. Alpha arbutin dapat menurunkan ekspresi MITF melalui penekanan jalur cAMP/PKA/CREB. Efek ini disebabkan oleh penurunan ROS dan penghambatan

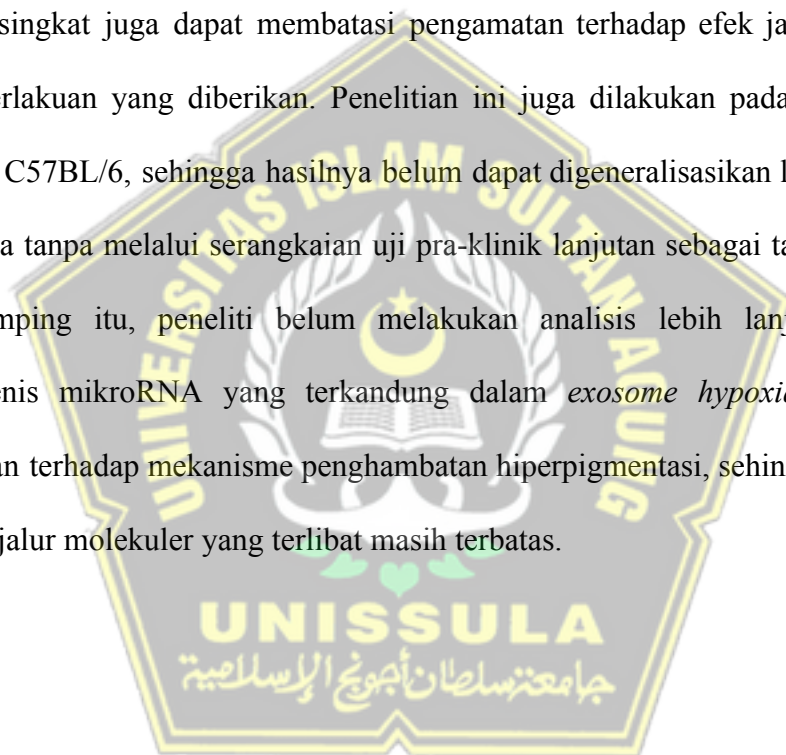
sinyal α -MSH di melanosit.⁶¹⁻⁶⁵ Niacinamide membantu menurunkan inflamasi dan menurunkan stress oksidatif sehingga mengurangi ekspresi gen-gen yang berhubungan dengan pigmentasi.⁶⁷⁻⁷⁰

Penelitian ini memperlihatkan bahwa secara analisa statistik, kombinasi pemberian EH-MSD dosis 200 μ l, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% terbukti sangat efektif dalam menurunkan kadar MDA dibandingkan dengan kelompok yang diberikan terapi gold standar yaitu topikal krim alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% (K3). Hasil yang signifikan juga terlihat antara kelompok kombinasi dan kelompok injeksi EH-MSD (K5).

Ekspresi MITF pada kombinasi pemberian EH-MSD dosis 200 μ l, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% secara analisa statistik tidak menunjukkan hasil yang signifikan dibanding kelompok kontrol negatif (K2), kelompok gold standar atau kontrol positif (K3) dan kelompok injeksi EH-MSD (K4). Namun jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K2) terjadi penurunan ekspresi MITF. Hasil ekspresi MITF yang tidak signifikan ini dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti Standar deviasi yang terlalu besar, jumlah sampel tiap kelompok terlalu sedikit dan mekanisme kerja dari perlakuan yaitu topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% tidak secara langsung mempengaruhi MITF. Perbedaan signifikan hanya terlihat di K1 mencit sehat tanpa paparan UVB terhadap K5 perlakuan kombinasi topikal alpha arbutin 5%, niacinamide 4%, dan injeksi EH-MSD. Hal ini disebabkan karena MITF banyak di ekspresikan pada mencit C57BL/6 untuk mempertahankan warna bulu yang hitam pekat. Sehingga menyebabkan nilai K1 lebih tinggi daripada K5. Analisa secara makroskopis

tampilan mencit C57BL/6 terjadi perbaikan warna kulit dibandingkan dengan K2, K3 dan K4.

Keterbatasan dalam penelitian ini mencakup jumlah sampel yang digunakan relatif kecil sehingga hasil penelitian ini masih perlu dikonfirmasi dengan jumlah hewan coba atau sampel dengan jumlah lebih banyak agar memiliki kekuatan statistik yang lebih kuat. Selain itu, durasi penelitian yang relatif singkat juga dapat membatasi pengamatan terhadap efek jangka panjang dari perlakuan yang diberikan. Penelitian ini juga dilakukan pada hewan coba mencit C57BL/6, sehingga hasilnya belum dapat digeneralisasikan langsung pada manusia tanpa melalui serangkaian uji pra-klinik lanjutan sebagai tahap translasi. Di samping itu, peneliti belum melakukan analisis lebih lanjut mengenai jenis-jenis mikroRNA yang terkandung dalam *exosome hypoxia MSC* yang berperan terhadap mekanisme penghambatan hiperpigmentasi, sehingga informasi terkait jalur molekuler yang terlibat masih terbatas.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh pemberian kombinasi EH-MSC dosis 200 µl secara injeksi subkutan, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% secara topikal pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi terhadap penurunan kadar MDA dan ekspresi MITF menunjukkan hal-hal berikut:

- a. Terdapat pengaruh pemberian kombinasi EH-MSC (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) dosis 200 µl, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% terhadap kadar MDA dan MITF pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.
- b. Pemberian kombinasi EH-MSC (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) dosis 200 µl, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- c. Tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap ekspresi MITF pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan baik dengan injeksi EH-MSC 200 µl tunggal maupun dikombinasi dengan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4%.

6.2. Saran

- a. Penelitian dapat dilanjutkan dengan menambah jumlah sampel tiap kelompok.
- b. Penelitian dapat dilanjutkan dengan memperpanjang durasi terapi.
- c. Studi lanjutan disarankan dilakukan pada model manusia dengan melalui serangkaian uji pre-klinis terlebih dahulu kemudian dilanjutkan dengan uji klinis untuk mengetahui efektivitas serta keamanannya pada kulit manusia.
- d. Studi lanjutan untuk memeriksa mikroRNA apa saja yang terkait dalam melanogenesis.



DAFTAR PUSTAKA

1. Nautiyal A, Wairkar S. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2021;34(6):1000–1014.
2. Solano F. Photoprotection and skin pigmentation: melanin-related molecules and some other new agents obtained from natural sources. *Molecules.* 2020;25(7):1537.
3. Darji K, Varade R, West D, Armbrecht ES, Guo MA. Psychosocial impact of postinflammatory hyperpigmentation in patients with acne vulgaris. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2017;10(5):18–23.
4. Anjani LAK, Laksmani PLN. Potensi Isokuersitrin Sebagai Agen Antihiperpigmentasi Secara In Silico Dengan Metode Molecular Docking. 2022;1.
5. Muhiyidin Firdaus M. Analisis Pencegahan Paparan Radiasi Sinar Ultraviolet oleh Matahari Menggunakan Sunscreen untuk Skin Barrier. *Jurnal Pendidikan Tambusai.* 2024;8(2):23321-23329.
6. Septiana E. Hubungan pengetahuan tentang sunscreen dan bahaya paparan sinar matahari dengan perilaku penggunaan sunscreen. *JIKMI.* 2023;3(1).
7. Viorizka PBB, Setyaningrum T, Qurnianingsih E, Damayanti. The profile and triggering factors of melasma patients: a retrospective study. *Berk Ilmu Kes Kulit Kelamin.* 2023;35(2):142–147.
8. Zainuddin F. The correlation between malondialdehyde serum levels and the duration of sun exposure. *Am J Clin Exp Med.* 2016;4(3):68.
9. Maddaleno AS, Camargo J, Mitjans M, Vinardell MP. Melanogenesis and melasma treatment. *Cosmetics.* 2021;8(3):82.
10. Hossain MR, Ansary TM, Komine M, Ohtsuki M. Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):3970.
11. Markiewicz E, Idowu O. Melanogenic difference consideration in ethnic skin type: a balance approach between skin brightening and sun exposure. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2020;13:215–232.
12. Tangau MJ, Chong YK, Yeong KY. Advances in cosmeceutical nanotechnology for hyperpigmentation treatment. *J Nanoparticle Res.* 2022;24.
13. Couteau C, Coiffard L. Overview of skin whitening agents: drugs and cosmetic products. *Cosmetics.* 2016;3(3):27.
14. Saeedi M, Khezri K, Zakaryaei SA, Mohammadamini H. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin. *Phytother Res.* 2021;35:4136–4154.
15. Soyata A, Chaerunisaa AY. Whitening Agent : Mekanisme, Sumber dari Alam dan Teknologi Formulasinya. *Majalah Farmasetika.* 2021 Apr 7;6(2):169.
16. Boo YC. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties. *Antioxidants.* 2021;10(7):1129.

17. Kim B, Lee SH, Choi KY, Kim HS. N-nicotinoyl tyramine, a novel niacinamide derivative, inhibits melanogenesis by suppressing MITF gene expression. *European Journal of Pharmacology*. 2015 Jul 1;764:1–8.
18. Bains P, Kaur M, Kaur J, Sharma S. Nicotinamide: Mechanism of action and indications in dermatology. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2018 Mar 1;84(2):234–7.
19. Tienda-Vázquez MA, et al. Exosomes: a promising strategy for skin disorders. *Cells*. 2023;12(12):1625.
20. De A, et al. Penggunaan eksosom saat ini dan masa depan dalam dermatologi. *J Dermatol India*. 2024;69(6):461–470.
21. Yang R, et al. Role of hypoxic exosomes in CNS. *Front Neurol*. 2023;14:1198546.
22. Lo Cicero A, et al. Exosomes released by keratinocytes modulate pigmentation. *Nat Commun*. 2015;6:7506.
23. Pratiwi NMG, et al. Potensi sinamaldehid sebagai anti hiperpigmentasi secara in silico. *J Ilmiah Medicamento*. 2021;7(2):95–101.
24. Malik DA, Riyanto P, Puruhito B, Damayanti GS, Kurniawan A. *Gambaran Histopatologi dan Tatalaksana Hipermelanosis*. 1st ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2024.
25. Maghfour J, et al. Review on the pathophysiology of post-inflammatory hyperpigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2022;35:320–327.
26. Silpa-Archa N, et al. Postinflammatory hyperpigmentation: comprehensive overview. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(4):591–605.
27. Markiewicz E, et al. Post-inflammatory hyperpigmentation in dark skin. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2022;15:2555–2565.
28. Li B, et al. Causes and solutions of skin pigmentation. *J Dermatol Sci Cosmet Technol*. 2024;1.
29. D'Mello S, et al. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1144.
30. Alam MB, et al. Inhibition of melanogenesis by jineol via MITF downregulation. *Sci Rep*. 2017;7:45858.
31. Moolla S, Miller-Monthrope Y. How to manage facial hyperpigmentation in skin of colour. *Drugs Context*. 2022;11:1–14.
32. Barrell A. Clinical practice insights for hyperpigmentation treatment. *Eur Med J*. 2024;30–38.
33. Asditya A, Sukanto H. Studi Retrospektif: Profil Pasien Melasma. *Periodical Dermatol Venereol*. 2017;29(3).
34. Thawabteh AM, et al. Skin pigmentation types, causes and treatment - a review. *Molecules*. 2023;28(12):4839.
35. Lee A, Lim J, Lim JS. Emerging roles of MITF as a crucial regulator of immunity. Vol. 56, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2024. p. 311–8.
36. Yu F, Lu Y, Zhong Z, Qu B, Wang M, Yu X, et al. Mitf Involved in Innate Immunity by Activating Tyrosinase-Mediated Melanin Synthesis in *Pteris penguin*. *Frontiers in Immunology*. 2021 May 20;12.

37. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32(2):224–236.
38. Lee SE, et al. Beauvericin inhibits melanogenesis via multiple pathways. *Sci Rep.* 2018;8:14958.
39. Hida T, et al. Elucidation of melanogenesis cascade. *Int J Mol Sci.* 2020;21:6129.
40. Wellbrock C, Arozarena I. MITF in melanoma development. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28:390–406.
41. Zhang L, et al. Protective effects of ζ -carotene-like compounds. *Int J Mol Sci.* 2023;24(18):13970.
42. Schlessinger DI, et al. Biokimia, melanin. *StatPearls.* 2025.
43. Kumari S, et al. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol.* 2018;98:924–931.
44. Cui YZ, Man XY. Biology of melanocytes in mammals. Vol. 11, *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* Frontiers Media SA; 2023.
45. Roider E, Lakatos AIT, McConnell AM, Wang P, Mueller A, Kawakami A, et al. MITF regulates IDH1, NNT, and a transcriptional program protecting melanoma from reactive oxygen species. *Scientific Reports* [Internet]. 2024 Sep 14;14(1):21527. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-72031-9>
46. Cordiano R, et al. Malondialdehyde as oxidative stress marker. *Molecules.* 2023;28(16):5979.
47. Nurrachmat Mulianto. Malondialdehid sebagai Penanda Stres Oksidatif pada Berbagai Penyakit Kulit. *Cermin Dunia Kedokteran* [Internet]. 2020 Feb. 3 [cited 2025 Apr. 20];47(1):39-44. Available from: <https://cdkjournal.com/index.php/cdk/article/view/13>
48. Anjani G, et al. Kadar MDA dan aktivitas SOD pada tikus defisiensi vitamin D dan kalsium. 2025;17(1).
49. Joneri R, et al. Penurunan kadar MDA oleh ekstrak bajakah tampala. *Damianus J Med.* 2024;23(1).
50. Xiong M, et al. Novel mechanisms of exosomes in dermatology. *Pharmacol Res.* 2021;166:105490.
51. Zhang B, et al. Exosomes in medical aesthetics. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10.
52. Jiang H, et al. Hypoxia-induced changes of exosome cargo. *Front Immunol.* 2022;13.
53. Chiaradia E, et al. Extracellular vesicles under oxidative stress. *Cells.* 2021;10.
54. He G, et al. Exosomes in the hypoxic TME. *Mol Cancer.* 2022;21(1).
55. Yang R, et al. Role of hypoxic exosomes in CNS. *Front Neurol.* 2023;14:1198546.
56. Bir A, et al. Exosomal dynamics in Alzheimer's disease. *Antioxidants.* 2024;13.
57. Liu Y, et al. Treatment of oxidative stress with exosomes. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1–18.

58. Wang T, et al. MSC-derived exosomes protect skin via NRF2. *Biomaterials*. 2020;257.
59. Zhang W, et al. MSC-derived EVs in oxidative stress diseases. *Front Immunol*. 2023;14.
60. Wang XY, et al. Exosomal miR-181a-5p and miR-199a in hyperpigmentation. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1).
61. Chandorkar N, et al. Alpha arbutin as a skin lightening agent. *Int J Pharm Res*. 2021.
62. Khan HMS, et al. Alpha arbutin in nanosized ethosomes. *Heliyon*. 2023.
63. Shu P, et al. Effect of α -arbutin on UVB-induced damage. *Molecules*. 2024.
64. Brombin A, Patton EE. Melanocyte lineage dynamics in development, growth and disease. Vol. 151, *Development* (Cambridge). Company of Biologists Ltd; 2024.
65. Mathpati S, et al. Efficacy of topical arbutin in pigmentation. *Int J Res Dermatol*. 2022.
66. Boo YC. Arbutin as depigmenting agent. *Antioxidants*. 2021;10(7):1129.
67. Marques C, et al. Functions of niacinamide in skincare. *Antioxidants*. 2024.
68. Aspadiah V, Ode Sitti Zubaydah W, Indalifiany A, Muliadi R. *Lansau: Jurnal Ilmu Kefarmasian Review: Perawatan Kulit dengan Niacinamide Sebagai Bahan Aktif A Review: Skin Care with Niacinamide as Active Substance*. Vol. 1. 2023.
69. Santoso GL, et al. Combination serum in skin brightness. *Int J Med Rev Case Rep*. 2018.
70. Zhen AX, Piao MJ, Kang KA, Fernando PDSM, Kang HK, Koh YS, et al. Niacinamide protects skin cells from oxidative stress induced by particulate matter. *Biomolecules and Therapeutics*. 2019;27(6):562–9.