

**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (EH-MSCs), ALPHA ARBUTIN
DAN NIACINAMIDE TERHADAP EKSPRESI
GEN p53 DAN *TYROSINASE* (TYR)
(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

Andhini Darma Saputri
MBK 2423010425

**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 EKSPRESI GEN p53 DAN *TYROSINASE* (TYR)
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB)**

Disusun oleh

Andhini Darma Saputri

MBK 2423010425

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, FINSDV, 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



(Andhini Darma Saputri)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Andhini Darma Saputri
Tempat / tanggal lahir : Makassar / 01 Januari 1988
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Jamiat Khair Ciledug : Lulus tahun 1993
2. SD Muhammadiyah 12 Pamulang : Lulus tahun 1999
3. SMPN 1 Pamulang : Lulus tahun 2002
4. SMAI Al-Azhar BSD : Lulus tahun 2005
5. S1 Fakultas Kedokteran Trisakti : Lulus tahun 2009
6. Profesi Dokter : Lulus tahun 2012
7. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : 2024 - Sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Suami : dr. M. Remy Sulisty, MH.Kes
2. Nama Anak : 1. Aqilla Queen Sulisty
2. M. Alvaro Sultan Sulisty

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, taufik, dan ridho-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“Pengaruh Kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs), Alpha Arbutin dan Niacinamide terhadap Ekspresi Gen *p53* dan *Tyrosinase* (TYR) (Studi Eksperimental in Vivo pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi yang Diinduksi Sinar UVB)”**.

Penyusunan tesis ini merupakan salah satu bentuk pemenuhan persyaratan untuk meraih gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Sehubungan dengan itu, penulis dengan penuh rasa hormat ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. H. Gunarto, SH, MH
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr.dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE, Subsp.DKE, FINS DV, FAADV sebagai dosen pembimbing pertama yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, arahan, serta motivasi sejak awal hingga tersusunnya tesis ini.

5. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku dosen pembimbing kedua atas arahan, dorongan, serta saran yang sangat konstruktif sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan lebih baik.
6. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes sebagai dosen penguji pertama atas ketelitian, kesabaran, serta masukan berharga yang telah diberikan selama proses ujian tesis.
7. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku dosen penguji kedua, yang memberikan arahan serta evaluasi mendalam untuk menyempurnakan hasil penelitian ini menjadi lebih komprehensif.
8. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen penguji ketiga, atas waktu, perhatian, serta motivasi untuk terus belajar dan berkembang di bidang keilmuan biomedik.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
10. Segenap staf administrasi program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
11. Kedua orang tua dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doanya.
12. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Dengan keterbatasan pengalaman, ilmu maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan pengembangan lanjut agar benar benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan

kritik dan saran agar tesis ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

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

Semarang, Agustus 2025

Penulis



(Andhini Darma Saputri)



DAFTAR ISI

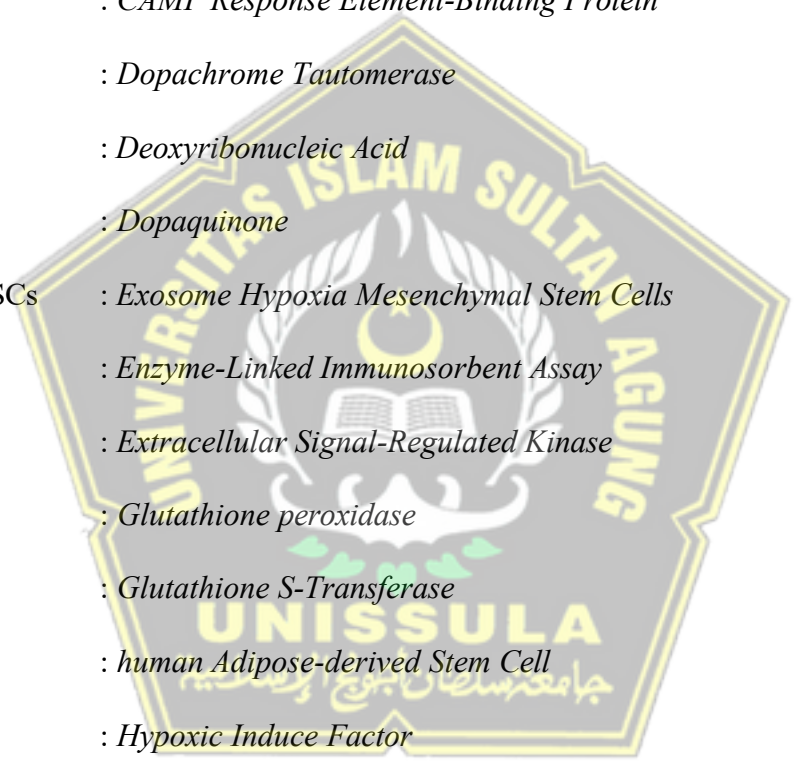
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.4. Originalitas Penelitian	6
1.5. Manfaat Penelitian	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Hiperpigmentasi.....	10
2.2 Melanin.....	14
2.3 <i>Tyrosinase</i> (TYR).....	21
2.4 Gen p53	23
2.6 Arbutin.....	32

2.7	Niacinamide.....	34
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP & HIPOTESIS		38
3.1.	Kerangka Teori	38
3.2.	Kerangka Konsep	41
3.3.	Hipotesis	41
BAB IV METODE PENELITIAN		42
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	42
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	43
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	45
4.4.	Alat dan Bahan	47
4.5.	Cara Penelitian.....	48
4.6.	Tempat dan Waktu Peneltian.....	51
4.7.	Analisa Data	51
4.8.	Alur Penelitian.....	53
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN		54
5.1.	Hasil Penelitian.....	54
5.1.1.	Hasil Validasi <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>	54
5.1.2.	Hasil Validasi Hiperpigmentasi.....	57
5.1.3.	Hasil Pemeriksaan Ekspresi Gen p53.....	60
5.1.4.	Hasil Pemeriksaan Ekspresi TYR	63
5.2.	Pembahasan Hasil Penelitian.....	66
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		71
6.1.	Kesimpulan.....	71

6.2. Saran.....	71
DAFTAR PUSTAKA.....	73
LAMPIRAN	77



DAFTAR SINGKATAN



Akt	: Protein Kinase B
cAMP	: <i>Cyclic AMP</i>
CD63	: <i>Cluster of Differentiation 63</i>
CD81	: <i>Cluster of Differentiation 81</i>
CD9	: <i>Cluster of Differentiation 9</i>
CREB	: <i>CAMP Response Element-Binding Protein</i>
DCT	: <i>Dopachrome Tautomerase</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DQ	: <i>Dopaquinone</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>
GST	: <i>Glutathione S-Transferase</i>
hASC	: <i>human Adipose-derived Stem Cell</i>
HIF	: <i>Hypoxic Induce Factor</i>
HNF-1 α	: <i>Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha</i>
HPLC	: <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HSP	: <i>Heat Shock Protein</i>
JAK/STAT	: <i>Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
L-Tirosin	: <i>Levo-Tirosin</i>
L-DOPA	: <i>Levo-Dihydroxyphenylalanine</i>

MAPK	: <i>Mithogen-actived Protein Kinase</i>
MC1-R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MDM2	: <i>Mouse Double Minute 2 homolog</i>
MDMX	: <i>Mouse Double Minute X homolog</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>
mTOR	: <i>Mechanistic (atau Mammalian) Target of Rapamycin</i>
MVBs	: <i>Multivesicular body</i>
MYO5A	: <i>Myosin VA</i>
NAD	: <i>Nukleotida Piridina Nikotinamida-Adenin Dinukleotida</i>
NADH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADP	: <i>Nikotinamida-Adenin Dinukleotida Fosfat</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
OCA1	: <i>Oculocutaneous Albinism</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAR	: <i>Protease-Activated Receptor</i>
PEG	: <i>Poly Ethylene Glycol</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PGF2	: <i>Prostaglandin F2</i>

PI3K	: <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PIH	: <i>Post-Inflammatory Hyperpigmentation</i>
PKA	: <i>Protein kinase A</i>
POMC	: <i>Pro-opiomelanocortin</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
qRT-PCR	: <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RAB27A	: <i>RAS-Related Protein Rab-27A</i>
Rap1a	: <i>RAS-related protein 1a</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SLAC2A	: <i>Synaptotagmin-Like Protein Containing a C2 Domain A</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TEM	: <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TYR	: <i>Tyrosinase</i>
TYRP 1	: <i>Tyrosinase-Related Protein 1</i>
TYRP2	: <i>Tyrosinase-Related Protein 2</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
α -MSH	: <i>α-Melanocyte-stimulating Hormone</i>
β -MSH	: <i>β-Melanocyte-stimulating Hormone</i>
γ -MSH	: <i>γ-Melanocyte-stimulating Hormone</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian	7
Tabel 5.1 Ekspresi Gen p53.....	61
Tabel 5.2 Hasil Uji <i>Mann Whitney</i> gen p53.....	62
Tabel 5.3 Ekspresi Gen TYR.....	64
Tabel 5.4 Hasil Uji <i>Mann Whitney</i> TYR.....	65



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pigmentasi Kulit Akibat Paparan Sinar UV	12
Gambar 2.2 Lapisan Epidermis dan Biogenesis Melanosome pada Melanosit	15
Gambar 2.3 Transfer Melanin	16
Gambar 2.4 Jalur Sintesis Eumelanin & Feomelanin	18
Gambar 2.5 Kaskade Transduksi Sinyal Melaogenesis	19
Gambar 2.6 Biogenesis & Komposisi Eksosom	26
Gambar 2.7 Mekanisme Kerja Alpha Arbutin Sebagai Pencerah.....	34
Gambar 2.8 Mekanisme Kerja Niacinamide.....	35
Gambar 3.1 Kerangka Teori.....	40
Gambar 3.2 Kerangka Konsep	41
Gambar 4.1 Alur Rancangan Penelitian	42
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	53
Gambar 5.1 Diferensiasi MSC	55
Gambar 5.2 Analisis <i>Flow Cytometry</i> terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90.....	56
Gambar 5.3 Analisis <i>Flow Cytometry</i> Kadar <i>Exosome</i> terhadap marker CD81, CD63 dan CD9.....	57
Gambar 5.4 Makroskopis Kulit Punggung Mencit C57BL/6.....	58
Gambar 5.5 Validasi Hiperpigmentasi dengan Masson Fontana.....	59
Gambar 5.6 Grafik Ekspresi Relatif Gen p53.....	63
Gambar 5.7 Grafik Ekspresi Relatif TYR	66

ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan sinar UVB diketahui dapat memicu stres oksidatif serta merusak DNA, yang pada akhirnya mengaktifkan gen p53 dan meningkatkan ekspresi *tyrosinase* (TYR). Kondisi ini mempercepat proses melanogenesis dan menimbulkan hiperpigmentasi. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) memiliki kandungan microRNA, protein antiinflamasi, dan faktor pertumbuhan yang berperan dalam menekan stres seluler sekaligus menghambat pembentukan melanin. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh EH-MSCs, baik secara tunggal maupun dalam kombinasi dengan alpha arbutin dan niacinamide, terhadap ekspresi gen p53 dan TYR pada kulit mencit yang terpapar UVB.

Metode : Penelitian menggunakan desain post-test only control group dengan 30 ekor mencit C57BL/6 yang dibagi menjadi lima kelompok (n=6). K1 merupakan kelompok sehat, K2 mendapat paparan UVB dengan NaCl, K3 mendapat UVB ditambah alpha arbutin 5% dan niacinamide 4%, K4 mendapat UVB dengan EH-MSCs 200 µl, dan K5 mendapat kombinasi UVB + EH-MSCs + alpha arbutin + niacinamide. Paparan UVB diberikan selama dua minggu, kemudian ekspresi gen p53 dan TYR dianalisis menggunakan quantitative real-time PCR. Data diuji dengan Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis, serta Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan kelompok K2 memiliki ekspresi p53 ($0,70 \pm 0,25$) dan TYR ($0,92 \pm 0,21$) tertinggi. Pemberian EH-MSCs tunggal (K4) menurunkan ekspresi p53 ($0,15 \pm 0,11$) dan TYR ($0,54 \pm 0,24$), lebih efektif dibanding kombinasi (K5). Kelompok K3 juga menurunkan ekspresi, namun tidak sebesar EH-MSCs.

Kesimpulan : Pemberian EH-MSCs tunggal lebih optimal menurunkan ekspresi gen p53 dan TYR pada kulit mencit yang terpapar UVB dibandingkan kombinasi dengan alpha arbutin dan niacinamide.

Kata kunci : UVB, hiperpigmentasi, p53, *tyrosinase* (TYR), *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*, alpha arbutin, niacinamide

ABSTRACT

Background : Exposure to UVB radiation is known to trigger oxidative stress and DNA damage, which subsequently activates the p53 gene and increases the expression of tyrosinase (TYR). This condition accelerates melanogenesis and leads to hyperpigmentation. Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs) contain microRNAs, anti-inflammatory proteins, and growth factors that can suppress cellular stress responses and inhibit melanin production. This study aimed to analyze the effects of EH-MSCs, either alone or in combination with alpha arbutin and niacinamide, on the expression of p53 and TYR genes in UVB-exposed mouse skin.

Methods : This research employed a post-test only control group design using 30 C57BL/6 mice, divided into five groups (n=6). K1 was the healthy control, K2 received UVB exposure with NaCl, K3 received UVB plus 5% alpha arbutin and 4% niacinamide, K4 received UVB with 200 µl EH-MSCs, and K5 received UVB with a combination of EH-MSCs, alpha arbutin, and niacinamide. UVB exposure was administered for two weeks, after which p53 and TYR gene expression was analyzed using quantitative real-time PCR. Data were tested with Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis, and Mann-Whitney tests ($p < 0.05$).

Results : The findings showed that group K2 had the highest expression levels of p53 (0.70 ± 0.25) and TYR (0.92 ± 0.21). Treatment with EH-MSCs alone (K4) significantly reduced p53 expression (0.15 ± 0.11) and TYR (0.54 ± 0.24), proving more effective than the combination treatment (K5). Group K3 also reduced gene expression, but not as effectively as EH-MSCs.

Conclusion :

Administration of EH-MSCs alone was more optimal in reducing the expression of p53 and TYR genes in UVB-exposed mouse skin compared to the combination with alpha arbutin and niacinamide.

Keywords : UVB, hyperpigmentation, p53, tyrosinase (TYR), Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells, alpha arbutin, niacinamide

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperpigmentasi kulit merupakan salah satu permasalahan estetika yang paling umum ditemui, terutama pada populasi dengan paparan sinar ultraviolet (UV) tinggi. Kondisi ini mencakup berbagai bentuk, seperti melasma, *post-inflammatory hyperpigmentation* (PIH), dan *solar lentigines*.¹ Berbagai faktor dapat menjadi penyebabnya, di antaranya paparan sinar UV, predisposisi genetik, usia, serta perilaku fotoproteksi yang kurang optimal. Di Indonesia, sebagai negara tropis dengan intensitas sinar matahari yang tinggi sepanjang tahun, paparan sinar UV menjadi salah satu faktor utama dalam peningkatan kasus hiperpigmentasi kulit.

Dalam studi observasional lintas-seksional, yang melibatkan 419 perempuan Indonesia berusia 20–60 tahun di Jakarta, ditemukan bahwa prevalensi melasma sangat tinggi bahkan sejak usia muda. Sekitar 71% perempuan usia 20–30 tahun telah mengalami melasma, dan prevalensinya meningkat drastis menjadi 100% pada kelompok usia 41 tahun ke atas. Tingkat keparahan melasma juga meningkat secara signifikan seiring bertambahnya usia, berdasarkan skor *Melasma Area and Severity Index* (MASI). Sebaliknya, prevalensi PIH lebih tinggi pada usia muda (71% pada 20–30 tahun) dan menurun dengan bertambahnya usia. *Solar lentigines* (lentigo akibat matahari) menunjukkan prevalensi konstan sekitar 30% hingga usia 50 tahun dan meningkat pada usia di atas 50.¹

Dalam studi subanalisis terhadap 1000 responden dari Indonesia menunjukkan bahwa 57% responden menyadari bahwa hiperpigmentasi adalah risiko utama dari paparan sinar matahari, namun hanya 13% yang secara rutin menggunakan semua bentuk perlindungan matahari seperti sunscreen, pakaian pelindung, dan menghindari matahari tengah hari. Hasil ini menyoroti kurangnya kesadaran masyarakat terhadap pentingnya fotoproteksi dalam pencegahan hiperpigmentasi serta lemahnya penerapan langkah preventif di masyarakat Indonesia.²

Proses pigmentasi kulit dikendalikan oleh aktivitas melanosit dan enzim *Tyrosinase* (TYR), yang memainkan peran sentral dalam biosintesis melanin.³ Paparan UVB dapat mengaktifasi ekspresi TYR, meningkatkan produksi melanin, dan menginduksi kerusakan DNA yang pada akhirnya dapat mengaktifkan jalur molekuler seperti ekspresi gen p53.⁴ Hal ini memperkuat urgensi pengembangan terapi yang tidak hanya bersifat kosmetik, tetapi juga memperbaiki kerusakan molekuler akibat UVB seperti ekspresi genetik p53 dan TYR.

Aktivasi gen p53 menunjukkan sifat yang bersifat ganda atau dualistik; di satu sisi, gen ini berfungsi sebagai mekanisme pertahanan penting bagi sel dengan melindungi dari kerusakan DNA yang dapat mengancam kelangsungan hidup dan kestabilan genetik sel tersebut. Namun, di sisi lain, aktivasi p53 juga dapat memicu berbagai perubahan fenotip pada kulit yang cukup kompleks, salah satunya meliputi modifikasi dalam proses pigmentasi kulit, yang pada akhirnya berkontribusi pada variasi warna dan tampilan kulit. Dengan demikian, peran p53 tidak hanya terbatas pada perlindungan

seluler, tetapi juga berdampak pada karakteristik fisik kulit melalui jalur biologis yang rumit.

Terapi hiperpigmentasi secara konvensional telah banyak mengandalkan penggunaan hidrokuinon dan tretinoin sebagai *gold standard*. Hidrokuinon bekerja sebagai *inhibitor tyrosinase* yang sangat poten dalam menghambat pembentukan melanin, sementara tretinoin (turunan vitamin A) meningkatkan pergantian sel kulit dan membantu penetrasi bahan aktif lain. Kombinasi keduanya telah digunakan luas dalam produk pencerah kulit dan terapi melasma, termasuk dalam formulasi terkenal seperti Kligman's formula.

Namun demikian, penggunaan jangka panjang dari hidrokuinon dan tretinoin tidak lepas dari efek samping. Hidrokuinon dapat menyebabkan iritasi kulit, hipopigmentasi paradoksikal, dan dalam beberapa kasus memicu kondisi okronosis eksogen, yaitu pigmentasi kebiruan yang sulit dihilangkan.⁵ Sementara itu, tretinoin dapat menyebabkan iritasi berat, deskuamasi, dan fotosensitivitas, terutama pada kulit sensitif.⁶ Selain itu, kedua zat ini tergolong sebagai bahan dengan regulasi ketat di beberapa negara karena risiko toksisitas dan efek samping jangka panjangnya.

Untuk itu, diperlukan agen depigmentasi yang lebih aman namun tetap efektif. Salah satu alternatif potensial adalah alpha arbutin, turunan hidrokuinon yang lebih stabil dan memiliki profil iritasi lebih rendah. Alpha arbutin bekerja sebagai *inhibitor tyrosinase* secara kompetitif, namun tanpa efek sitotoksik seperti hidrokuinon.⁷ Di sisi lain, niacinamide (vitamin B3) menunjukkan kemampuan untuk menghambat transfer melanosom dari

melanosit ke keratinosit, sehingga mengurangi pigmentasi kulit tanpa memengaruhi produksi melanin secara langsung.⁸ Kombinasi kedua zat ini menawarkan pendekatan ganda yang lebih aman dan lembut bagi kulit, dengan target kerja yang berbeda namun saling melengkapi.

Pendekatan terapi estetika berbasis molekuler semakin berkembang, dan saat ini terapi kombinasi menjadi sorotan utama. Salah satu pendekatan inovatif adalah penggunaan *exosome* yang berasal dari *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs), terutama yang dikondisikan dalam kondisi hipoksia. *Exosome* ini mengandung berbagai kargo bioaktif seperti mikroRNA, protein, dan faktor pertumbuhan yang mampu memodulasi ekspresi gen target, termasuk gen yang berperan dalam proses pigmentasi dan perbaikan DNA.⁹

Exosome yang berasal dari *Hypoxia-conditioned Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) dengan dosis 200 µl telah menunjukkan potensi dalam menekan jalur penuaan dan pigmentasi kulit akibat sinar UVB, termasuk melalui regulasi ekspresi gen p53 dan TYR.¹⁰ Selain itu, komponen mikroRNA dalam *exosome* terbukti dapat mempengaruhi jalur melanogenesis dan menurunkan ekspresi gen p53 yang diinduksi stres oksidatif, sehingga menjanjikan sebagai agen terapeutik molekuler untuk hiperpigmentasi.¹¹

Sementara itu, agen topikal seperti alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% telah lama digunakan secara luas dalam bidang dermatologi estetika karena efek depigmentasi dan anti inflamasi mereka. Kombinasi kedua zat ini dengan *Exosome Hypoxia-conditioned Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) berpotensi menghasilkan efek sinergis dalam menurunkan

hiperpigmentasi secara lebih efektif. Pendekatan berbasis kombinasi bahan aktif dengan mekanisme kerja yang berbeda sering diterapkan untuk meningkatkan efektivitas agen pencerah kulit.

Pigmentasi kulit dikendalikan melalui berbagai jalur biologis yang kompleks, sehingga diperlukan strategi multi-target untuk mengoptimalkan hasil. Target terapi tidak hanya menargetkan enzim pigmentasi tetapi juga memperbaiki kerusakan sel akibat stres oksidatif karena paparan sinar UVB dan menghambat transfer melanin dari melanosit ke keratinosit sehingga tidak terjadi akumulasi melanin di lapisan epidermis, dan kulit tidak terlihat area yang menggelap.^{12,13}

Hingga saat ini, belum banyak studi yang mengevaluasi secara menyeluruh pengaruh kombinasi EH-MSCs, alpha arbutin, dan niacinamide terhadap ekspresi genetik yang spesifik seperti p53 dan TYR pada model hewan *in vivo* yang mengalami hiperpigmentasi akibat sinar UVB. Oleh karena itu, penelitian ini menjadi penting dalam menggali potensi terapi kombinasi berbasis regeneratif (perbaikan sel) dan kosmetik molekuler terhadap regulasi pigmentasi kulit.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 μ l, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi gen p53 dan *Tyrosinase* (TYR) pada mencit C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi sinar UVB ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Tujuan umum yang ingin dicapai penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH- MSCs) 200 μ l, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi gen p53 dan *Tyrosinase* (TYR) pada mencit C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi sinar UVB.

1.3.2. Tujuan khusus

1.3.2.1. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi gen p53 pada mencit C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi sinar UVB yang diberikan kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 μ l, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.3.2.2. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi *Tyrosinase* (TYR) pada mencit model C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi sinar UVB yang diberikan kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH- MSCs) 200 μ l, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Berdasarkan kajian dari sejumlah penelitian sebelumnya, terapi berbasis *exosome* telah diteliti sebagai pendekatan potensial dalam penanganan hiperpigmentasi. Namun demikian, hingga saat ini belum ditemukan penelitian yang secara spesifik mengevaluasi pengaruh kombinasi

pemberian EH-MSCs 200 μ l, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% terhadap ekspresi gen p53 dan *Tyrosinase* (TYR) pada mencit C57BL/6 yang diinduksi hiperpigmentasi melalui paparan sinar UVB. Hal ini menunjukkan adanya celah ilmiah yang penting untuk diteliti lebih lanjut.

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Ying Liu, et al, 2019	<i>Exosomal miRNA derived from keratinocytes regulates pigmentation in melanocytes</i>	Ekspresi miRNA-330-5p dalam <i>exosome</i> yang berasal dari keratinosit	Exosome yang berasal dari keratinosit dengan over ekspresi miR-330-5p menyebabkan penurunan signifikan dalam produksi melanin dan ekspresi enzim TYR pada melanosit
2	In-Seon Bae and Sang Hoon Kim, 2021	<i>Milk Exosome-Derived MicroRNA-2478 Suppresses Melanogenesis through the Akt-GSK3β Pathway</i>	Ekspresi miRNA-2478 yang berasal dari <i>exosome</i> susu	<i>Exosome</i> susu yang mengandung miRNA-2478 menurunkan kandungan melanin, aktivitas TYR
3	Moragot Chatatikun, et al, 2020	<i>Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Properties of an Aqueous Extract of Garcinia atroviridis Griff.ex. T. Anderson Fruit Pericarps</i>	Pemberian ekstrak air dari perikarp buah <i>Garcinia atroviridis</i> Griff. Ex. T. Anderson	Ekstrak air dari perikarp buah <i>Garcinia atroviridis</i> dapat menjadi sumber senyawa alami dengan kapasitas antioksidan yang mampu menghambat

				aktivitas TYR dan produksi melanin, sehingga berpotensi sebagai agen pencerah kulit untuk mengatasi hiperpigmentasi
4	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 hAESC dan hAMSC diidentifikasi melalui RT-PCR, analisis <i>flow cytometric</i>, dan imunofluoresensi	hASC maupun CM-nya secara signifikan mengurangi α-MSH pada sel B16F10 atau hiperpigmentasi yang diinduksi UVB. <i>Exosome</i> hASC secara signifikan menghambat melanogenesis dengan menekan MITF yang merupakan regulator utama untuk mengatur melanogenesis
5	Jessica Angelina, <i>et al</i> , 2024	<i>Hypoxia conditioned mesenchymal stem cells (MSC) exosomes attenuate ultraviolet-B (UVB)-mediated malondialdehyde (MDA) and matrix metalloproteinase-1 (MMP)-1 upregulation in collagen loss</i>	Pemberian beberapa dosis injeksi EH-MSC dan ELISA digunakan untuk mengukur tingkat MDA dan MMP-1	EH-MSC memiliki sifat anti oksidan dan anti inflamasi yang kuat, mengurangi kerusakan kulit akibat UVB dengan mengurangi penanda stres oksidatif

1.5 Manfaat penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Manfaat yang ingin didapat dari penelitian ini adalah memberikan bukti ilmiah peran kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 μ l, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi gen p53 dan TYR pada mencit C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi sinar UVB.

1.5.2 Manfaat Praktis

1.5.2.1 Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan yang berguna bagi masyarakat mengenai kegunaan kombinasi *Exosomes Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 μ l, alpha arbutin 5% dan niacinamides 4% untuk perlindungan kulit.

1.5.2.2 Bagi praktisi kesehatan, temuan ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi dengan kombinasi *Exosomes Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 μ l berbasis regeneratif (perbaikan sel), dan alpha arbutin 5% dengan niacinamide 4% sebagai agen anti inflamasi bagi individu yang terpapar sinar UVB dengan intensitas tinggi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hiperpigmentasi

2.1.1 Definisi

Hiperpigmentasi merupakan kondisi perubahan warna kulit menjadi lebih gelap akibat berbagai faktor yang mempengaruhi produksi dan distribusi pigmen melanin. Kondisi ini umumnya ditandai dengan peningkatan akumulasi melanin pada lapisan epidermis maupun dermis, yang dapat terjadi secara lokal maupun menyeluruh.¹⁴

Beberapa faktor yang berkontribusi terhadap hiperpigmentasi meliputi akumulasi pigmen endogen dan eksogen, seperti hemosiderin, zat besi, serta paparan logam berat yang dapat memicu perubahan warna kulit. Selain itu, elemen lain seperti keberadaan karotenoid, tingkat vaskularisasi kulit, serta ketebalan epidermis dan dermis juga berperan dalam menentukan tampilan warna kulit seseorang.¹⁵

Namun, faktor utama yang paling berpengaruh dalam menentukan warna kulit manusia adalah jumlah, kualitas, serta distribusi melanin dalam lapisan epidermis. Ketidakseimbangan dalam proses produksi dan penyebaran melanin ini dapat menyebabkan munculnya bercak hiperpigmentasi yang bervariasi dalam intensitas dan pola distribusinya.

2.1.2 Etiologi Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi merupakan kondisi kulit yang disebabkan oleh berbagai faktor, baik internal maupun eksternal. Salah satu penyebab utama adalah paparan sinar matahari, di mana radiasi UV merangsang produksi melanin sebagai bentuk perlindungan alami kulit. Aktivasi enzim TYR akibat sinar UV meningkatkan proses melanogenesis, yang dapat menyebabkan penumpukan melanin dan munculnya bercak-bercak gelap.¹⁶

Paparan sinar matahari adalah salah satu penyebab umum munculnya pigmentasi kulit. Sebagai bentuk perlindungan, tubuh akan memproduksi lebih banyak melanin, yaitu pigmen alami kulit, untuk melindungi diri dari sinar UV. Proses ini menyebabkan kulit menjadi lebih gelap atau muncul bintik-bintik, sebagai upaya alami untuk menyerap dan menangkal efek sinar matahari.

Gambar 2.1 menunjukkan bagaimana paparan UV yang terus-menerus dapat memicu terbentuknya pigmentasi kulit. Proses ini berlangsung dalam beberapa tahap berikut :¹⁶

- Sinar UV menghasilkan radikal bebas di kulit.
- Radikal bebas dan sinar UV mengaktifkan zat-zat biologis dalam tubuh yang kemudian memengaruhi melanosit, yaitu sel yang bertugas memproduksi melanin.
- Enzim *tyrosinase* mengubah asam amino *tyrosin* menjadi pigmen melanin, yang bisa berwarna merah atau coklat tergantung jenis dan jumlahnya.

- Zat-zat biologis tertentu ikut meningkatkan aktivitas enzim tirosinase, sehingga produksi pigmen juga meningkat.
- Seiring waktu, sel-sel kulit yang mengandung melanin akan naik ke lapisan permukaan kulit dan terangkat melalui proses pengelupasan alami.

Dalam proses ini, melanin disalurkan ke keratinosit (sel kulit) dalam bentuk butiran kecil (granula), yang memberi warna alami pada kulit.



Gambar 2.1. Pigmentasi Kulit Akibat Paparan Sinar UV ¹⁶

Selain itu, faktor genetik juga berperan penting dalam menentukan pigmentasi kulit, dengan lebih dari 125 gen yang berkontribusi dalam produksi melanin. Mutasi pada gen tertentu dapat menyebabkan gangguan pigmentasi seperti albinisme atau sindrom *Waardenburg*.¹⁶

Selain faktor genetik dan lingkungan, perubahan hormon juga mempengaruhi hiperpigmentasi. Hormon estrogen dan progesteron dapat meningkatkan produksi melanin, terutama saat kulit terpapar sinar matahari.

Hal ini sering terlihat pada kondisi seperti melasma, yang umum terjadi pada wanita hamil atau pengguna kontrasepsi hormonal.¹⁶

Seiring bertambahnya usia, proses penuaan juga mempengaruhi pigmentasi kulit. Jumlah melanosit berkurang, tetapi yang tersisa menjadi lebih besar dan lebih aktif, menyebabkan munculnya bintik penuaan atau *age spots* pada orang berusia di atas 40 tahun. Selain itu, peradangan atau cedera kulit juga dapat memicu hiperpigmentasi, terutama dalam bentuk hiperpigmentasi pasca-inflamasi. Kondisi ini terjadi setelah kulit mengalami peradangan akibat jerawat, psoriasis, dermatitis atopik, luka bakar, atau paparan bahan kimia, di mana area yang terkena sering kali menjadi lebih gelap setelah sembuh.¹⁶

Penggunaan obat-obatan tertentu, seperti antibiotik, pil kontrasepsi, antimalaria, dan antidepresan trisiklik, juga dapat memicu hiperpigmentasi dengan meningkatkan produksi melanin atau menyebabkan reaksi fototoksik yang memperparah perubahan warna kulit. Selain faktor-faktor tersebut, beberapa penyakit tertentu, seperti penyakit Addison, dapat menyebabkan bercak kulit menghitam akibat berkurangnya aktivitas kelenjar adrenal.¹⁶ Beberapa gangguan metabolik dan autoimun lainnya juga diketahui dapat memengaruhi produksi melanin.

Di sisi lain, prosedur dermatologis seperti terapi laser dan terapi cahaya dapat menimbulkan efek samping berupa hiperpigmentasi akibat reaksi inflamasi yang dipicu oleh prosedur tersebut. Dengan banyaknya faktor yang berkontribusi terhadap hiperpigmentasi, pendekatan

pengobatan yang tepat harus mempertimbangkan penyebab spesifik untuk mendapatkan hasil yang optimal.

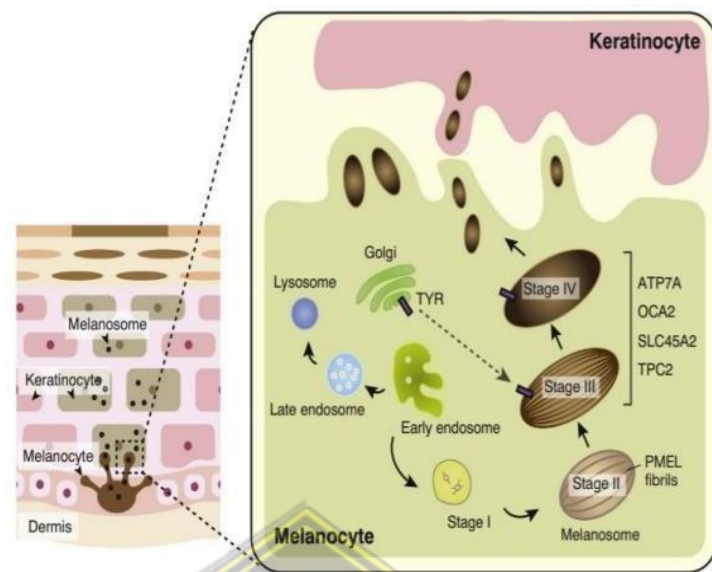
2.2 Melanin

Melanin adalah pigmen alami yang bertanggung jawab atas warna kulit, rambut, dan mata. Melanin diproduksi dalam melanosom, yaitu organel yang terletak di dalam melanosit di lapisan basal epidermis. Proses pembentukan melanin disebut melanogenesis, yang dikendalikan oleh berbagai faktor, termasuk enzim *tyrosinase* dan faktor transkripsi seperti MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*).¹⁴

Melanin disintesis di dalam melanosom, yaitu organel yang berhubungan dengan lisosom dalam melanosit, dan berperan dalam melindungi kulit dari efek berbahaya sinar matahari, obat-obatan beracun, dan bahan kimia. Melanin berfungsi membantu melindungi kulit dari efek berbahaya sinar matahari dan bahan kimia.

Melanosom mengalami empat tahap perkembangan, yaitu :¹⁴

- Stadium I : Premelanosom berbentuk bulat dengan matriks amorf.
- Stadium II : Melanosom mulai berbentuk oval tetapi belum mengandung melanin.
- Stadium III : Aktivitas *tyrosinase* meningkat, dan produksi melanin dimulai.
- Stadium IV : Melanosom penuh dengan melanin dan siap untuk ditransfer ke keratinosit.



Gambar 2.2. Lapisan epidermis dan biogenesis melanosome pada melanosit ¹⁴

Setelah melanin diproduksi dalam melanosom di dalam melanosit, pigmen ini kemudian ditransfer ke keratinosit melalui beberapa mekanisme yang masih belum sepenuhnya dipahami. Berikut beberapa hipotesis tentang cara bagaimana melanin (butiran pigmen) berpindah dari melanosit (sel penghasil pigmen) ke keratinosit (sel kulit bagian luar) :¹⁷

- Sitofagositosis (*Cytophagocytosis*)

Proses ini terjadi ketika ujung dendrit dari melanosit “dimakan” oleh keratinosit. Di dalam keratinosit, bagian ini akan membentuk kantong khusus (fagosom) yang kemudian melepaskan granula melanin ke seluruh sitoplasma, menyebarkan pigmen di dalam sel.

- Fusi Membran Langsung (*Direct Membrane Fusion*)

Dalam model ini, membran sel melanosit dan keratinosit menyatu langsung, membentuk semacam jembatan kecil (nanotube) yang

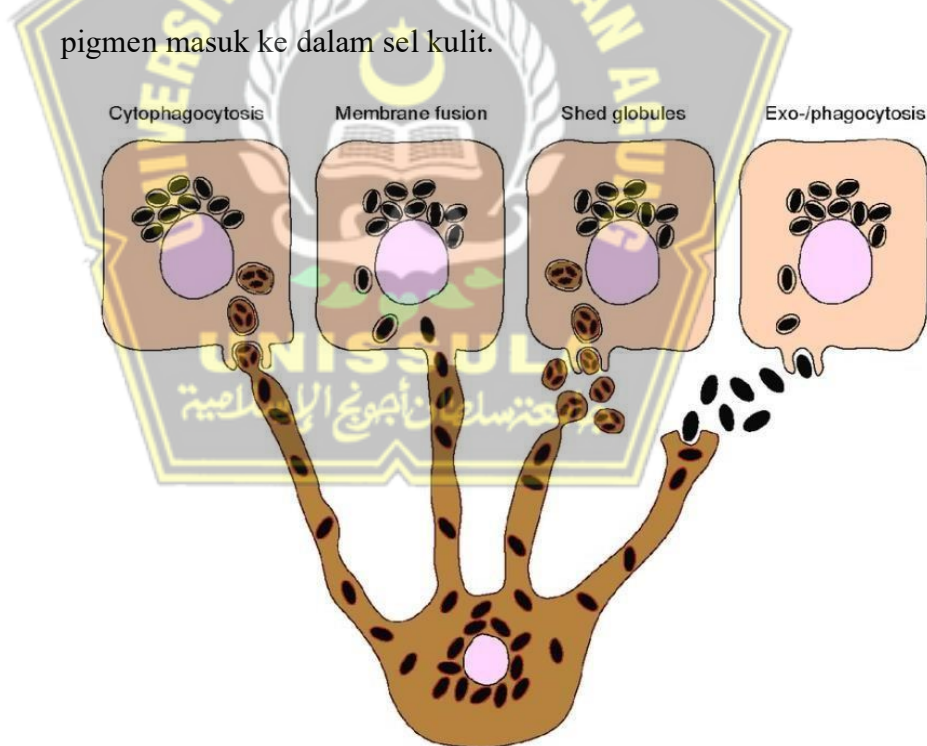
memungkinkan melanosom (kantong berisi melanin) bergerak langsung dari satu sel ke sel lainnya.

- Vesikel yang Dilepaskan (*Shed Vesicles*)

Melanosit melepaskan melanosom dalam bentuk vesikel kecil ke lingkungan sekitar. Vesikel ini kemudian menempel atau diserap oleh keratinosit, memasukkan pigmen ke dalam sel kulit.

- Eksositosis dan Fagositosis Gabungan (*Coupled Exo/Phagocytosis*)

Dalam model ini, melanin dikeluarkan ke luar sel melanosit melalui fusi membran melanosom dengan permukaan sel. Setelah itu, keratinosit akan "menelan" melanin tersebut melalui proses fagositosis, dan pigmen masuk ke dalam sel kulit.



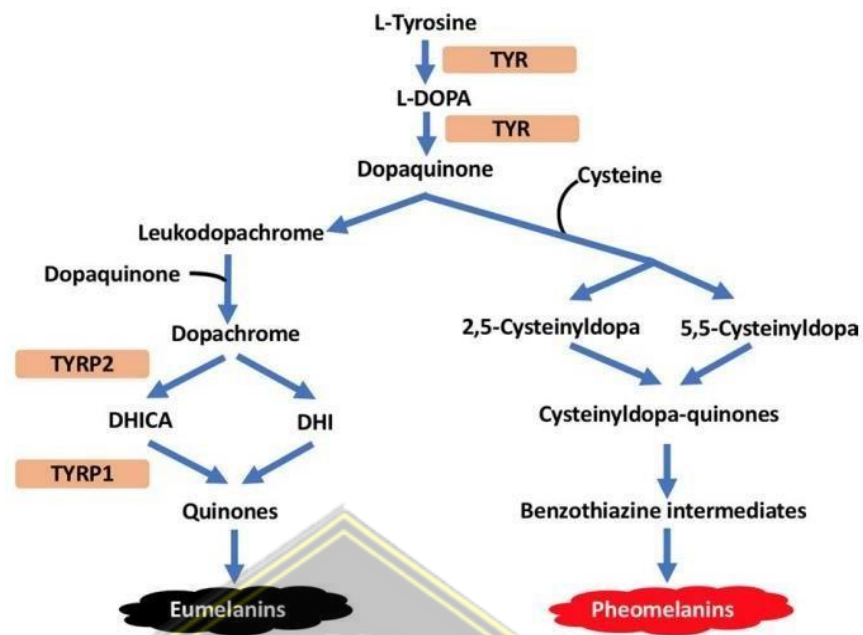
Gambar 2.3. Transfer melanin ¹⁸

Terdapat dua jenis utama melanin yang menentukan variasi warna kulit dan rambut manusia, yaitu eumelanin yang berwarna coklat kehitaman, memberikan perlindungan optimal terhadap sinar UV. Orang dengan kulit gelap memiliki lebih banyak eumelanin yang membantu mengurangi risiko kanker kulit. Sedangkan pheomelanin yang berwarna kuning kemerahan, lebih banyak ditemukan pada individu berambut merah atau pirang. Pheomelanin kurang efektif dalam melindungi dari sinar UV dan cenderung meningkatkan risiko kerusakan akibat radikal bebas.¹⁴

Melanogenesis adalah proses bertahap yang melibatkan beberapa enzim utama, termasuk *tyrosinase* (TYR), *tyrosinase-related protein 1* (TYRP1), dan *tyrosinase-related protein 2* (TYRP2/DCT). Proses ini dimulai dari hidroksilasi fenilalanin menjadi L-tirosin, yang kemudian dikonversi menjadi L-DOPA oleh *tyrosinase*. L-DOPA kemudian dioksidasi menjadi DOPAquinone (DQ), yang merupakan prekursor utama dalam produksi melanin.¹⁹

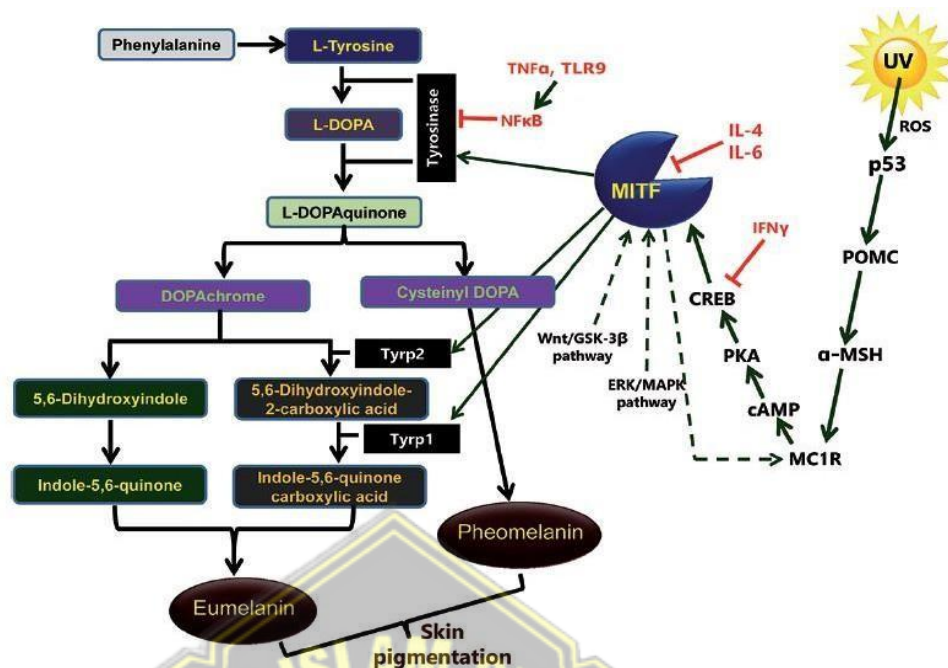
Setelah pembentukan DOPAquinone, jalur melanogenesis bercabang menjadi dua, yaitu :¹⁹

- Dalam kondisi tanpa keberadaan sistein, DOPAquinone mengalami konversi menjadi eumelanin melalui serangkaian reaksi enzimatik dan non-enzimatik.
- Jika sistein hadir, DOPAquinone akan berinteraksi dengan sistein membentuk cysteinyl-DOPA, yang kemudian diubah menjadi pheomelanin.



Gambar 2.4. Jalur sintesis Eumelanin dan Feomelanin ¹⁹

Regulasi melanogenesis merupakan proses kompleks yang melibatkan berbagai jalur pensinyalan molekuler, faktor transkripsi, serta enzim yang berperan dalam produksi dan distribusi melanin di dalam kulit. Proses ini dikendalikan oleh TYR sebagai enzim utama, yang bekerja dalam koordinasi dengan TYRP1 dan TYRP2/DCT untuk mengkatalisasi pembentukan melanin dari tirosin. Regulasi melanogenesis sangat dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti paparan sinar UV, serta faktor internal seperti genetik, hormon, dan sistem imun. ²⁰



Gambar 2.5. Kaskade transduksi sinyal melanogenesis²⁰

Paparan sinar UV menyebabkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang mengaktivasi p53. Tumor supresor protein p53 meningkatkan ekspresi *proopiomelanocortin* (POMC), yang selanjutnya dipecah menjadi α -MSH, β -MSH, dan γ -MSH. α -MSH yang berasal dari POMC menstimulasi *melanocortin 1 receptor* (MC1R) pada melanosit, mengaktifkan jalur cAMP/PKA, meningkatkan MITF dan produksi melanin sebagai respons perlindungan kulit terhadap radiasi UV.²⁰

Salah satu regulator utama dalam melanogenesis adalah MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*), yang mengendalikan ekspresi enzim-enzim kunci dalam sintesis melanin. MITF adalah faktor transkripsi, yang memiliki struktur *basic helix-loop-helix-leucine zipper*

(bHLH-LZ) dan berperan sebagai regulator utama dalam perkembangan melanosit, kelangsungan hidup, dan fungsinya.

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) diaktifkan melalui beberapa jalur pensinyalan, termasuk jalur cAMP-PKA, Wnt/ β -catenin, dan MAPK/ERK. Jalur cAMP-PKA diaktifkan oleh *melanocyte-stimulating hormone* (MSH) yang berikatan dengan reseptor MC1R (*melanocortin 1 receptor*), proses ini memicu produksi cAMP melalui aktivasi *adenylyl cyclase*. Selanjutnya cAMP mengaktifkan protein kinase A (PKA), yang kemudian memfosforilasi *cAMP response element binding protein* (CREB), sehingga meningkatkan ekspresi MITF dan menginduksi sintesis *tyrosinase* serta enzim lainnya.²⁰

Faktor-faktor hormonal seperti estrogen dan progesteron dapat meningkatkan ekspresi MITF dan enzim melanogenesis, yang menjelaskan bagaimana kondisi seperti melasma lebih sering terjadi pada wanita, terutama selama kehamilan atau penggunaan kontrasepsi hormonal.

Selain regulasi genetik dan hormonal, transportasi melanosom dari melanosit ke keratinosit juga menjadi faktor penting dalam distribusi melanin di kulit. Protein seperti RAB27A, MYO5A, dan SLAC2A berperan dalam pergerakan melanosom di dalam sitoplasma melanosit menuju ujung dendritnya sebelum ditransfer ke keratinosit. Proses transfer ini memastikan bahwa melanin tersebar secara merata di lapisan epidermis, sehingga memberikan perlindungan optimal terhadap kerusakan akibat radiasi UV.²⁰

Pemahaman tentang mekanisme regulasi melanogenesis ini menjadi dasar dalam pengembangan agen depigmentasi, yang bekerja dengan cara

menghambat enzim *tyrosinase*, menekan ekspresi MITF, atau mengganggu transportasi melanosom. Senyawa seperti hidrokuinon, arbutin, asam kojic, dan niacinamide telah banyak digunakan dalam terapi hiperpigmentasi karena kemampuannya dalam menghambat berbagai aspek dalam proses produksi melanin.

Dengan semakin berkembangnya penelitian tentang regulasi melanogenesis, pendekatan terapeutik yang lebih spesifik dan aman dapat dikembangkan untuk mengatasi gangguan pigmentasi, baik hiperpigmentasi maupun hipopigmentasi.

2.3 *Tyrosinase* (TYR)

Tyrosinase (TYR) merupakan enzim kunci dalam jalur biosintesis melanin yang memegang peran penting dalam pewarnaan kulit, rambut, dan mata manusia. Enzim ini termasuk dalam keluarga protein tipe-3 tembaga (*type-3 copper protein*), dengan dua ion tembaga (CuA dan CuB) di pusat aktifnya yang masing-masing dikoordinasi oleh tiga residu histidin.²¹

Aktivitas TYR mencakup dua reaksi utama: hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi dopaquinone, yang selanjutnya akan dikonversi menjadi melanin melalui serangkaian reaksi enzimatik di dalam melanosom. Struktur TYR terdiri dari domain sinyal, domain intramelanosomal (dengan subdomain kaya sistein), domain transmembran, dan ekor sitoplasmik.

Penelitian menunjukkan bahwa mutasi pada TYR, terutama di area situs aktif atau subdomain kaya-sistein, dapat menyebabkan gangguan genetik seperti *oculocutaneous albinism* (OCA1), suatu kondisi genetik resesif yang ditandai dengan penurunan drastis produksi melanin atau tidak ada sama sekali. Sebaliknya, produksi melanin yang berlebihan atau distribusi yang tidak merata dapat menyebabkan gangguan pigmentasi seperti melasma, bintik penuaan, atau hiperpigmentasi akibat inflamasi.¹⁴

Aktivitas TYR dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, yaitu paparan sinar UV merangsang aktivitas TYR, yang meningkatkan produksi melanin sebagai mekanisme perlindungan kulit terhadap kerusakan akibat radiasi. Faktor *Melanocyte-Stimulating Hormone* (MSH), estrogen, dan progesteron dapat meningkatkan ekspresi TYR, terutama pada kondisi seperti melasma. Beberapa jalur pensinyalan seperti *cAMP-protein kinase A* (PKA), *protein kinase C* (PKC), dan faktor pertumbuhan (bFGF, endothelin) dapat meningkatkan ekspresi *tyrosinase*.

Karena TYR merupakan enzim pengatur laju dalam melanogenesis, ia menjadi target penting dalam pengembangan agen pencerah kulit maupun terapi adjuvan untuk melanoma. Pemodelan struktur TYR dan interaksinya dengan inhibitor seperti kojic acid, arbutin, dan senyawa tropolon menjadi fokus utama dalam desain terapi estetika berbasis molekuler. Beberapa *inhibitor tyrosinase* yang umum digunakan meliputi :¹⁴

- Hidrokuinon : Penghambat TYR yang kuat, tetapi memiliki risiko efek samping seperti iritasi dan okronosis eksogen.

- Arbutin (terutama α -arbutin): Turunan hidrokuinon yang lebih aman dan bekerja dengan menghambat aktivitas TYR.
- Asam Kojic: Menghambat sintesis melanin dengan mengkelasi ion tembaga dalam situs aktif TYR.

Dengan demikian, pemahaman menyeluruh terhadap struktur dan fungsi TYR sangat penting dalam konteks fisiologi normal maupun pengembangan strategi penghambatan hiperpigmentasi.

2.4 Gen p53

2.4.1 Definisi

Gen p53, dikenal sebagai *guardian of the genome*, merupakan faktor transkripsi yang sangat penting dalam menjaga integritas genom. Gen p53 adalah faktor transkripsi yang didistribusikan dalam nukleus dan sitoplasma, mengikat secara spesifik ke DNA, dan mengatur keragaman gen. Gen protein ini merupakan faktor transkripsi yang mengatur berbagai jalur biologis penting, seperti perbaikan DNA, siklus sel, apoptosis, autofagi, stabilitas genom, metabolisme, ferroptosis, dan respon stres seluler lainnya.²²

Dalam kondisi normal, kadar protein p53 seluler dijaga pada level rendah oleh regulator negatifnya MDM2/MDMX melalui ubiquitinasi dan degradasi proteasomal. Ketika terjadi stres seluler seperti kerusakan DNA akibat UV, hipoksia, atau stres oksidatif, p53 menjadi aktif dan stabil, lalu

membentuk tetramer dan mengikat DNA target untuk mengaktifkan atau menekan gen tertentu.²²

2.4.2 Peran p53 dalam Hiperpigmentasi

Paparan sinar UVB dapat menyebabkan kerusakan DNA pada sel kulit, yang kemudian mengaktifkan p53. Aktivasi p53 mendorong ekspresi POMC yang dipecah menjadi α -MSH, yang kemudian mengaktifkan MC1R di melanosit. Aktivasi ini meningkatkan ekspresi MITF, yang memicu transkripsi TYR, enzim utama dalam sintesis melanin. Artinya, p53 berkontribusi langsung terhadap peningkatan pigmentasi kulit melalui jalur molekuler, sebagai bentuk respons protektif terhadap kerusakan UV.²³

Gen p53 memiliki dua peran yang saling bertolak belakang tergantung pada kondisi aktivasi di dalam sel. Saat sel mengalami stres, seperti kerusakan DNA akibat paparan sinar UVB, p53 akan teraktivasi secara fungsional. Aktivasi ini merangsang jalur pigmentasi melalui peningkatan produksi α -MSH dan ekspresi gen TYR, sehingga menyebabkan peningkatan produksi melanin dan munculnya hiperpigmentasi sebagai mekanisme perlindungan.

Sebaliknya, jika p53 hanya mengalami peningkatan ekspresi (over ekspresi) tanpa aktivasi oleh stres, maka gen ini justru dapat menekan ekspresi TYR. Artinya, bukan hanya jumlah p53 yang penting, tetapi juga status aktivasi fungsionalnya, yang menentukan apakah p53 akan merangsang atau justru menekan produksi melanin.²³

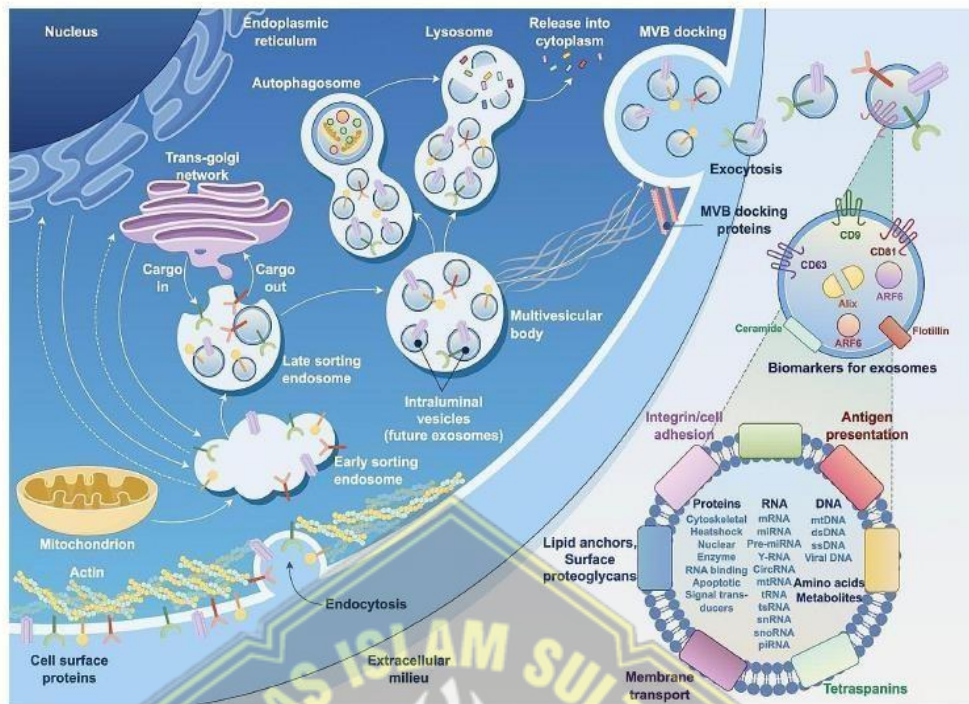
Memahami peran p53 dalam meningkatkan ekspresi TYR dan melanin membuatnya menjadi target penting dalam strategi molekuler untuk:

- Menghambat jalur pigmentasi berbasis p53
- Mengembangkan agen baru seperti *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSC), antioksidan, dan modulator p53
- Menggabungkan pendekatan ini dengan *inhibitor* TYR seperti niacinamide dan alpha arbutin untuk efek sinergis

2.5 *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSC)

2.5.1 *Exosome* MSC

Exosome merupakan hasil dari metabolit *stem cell* yang berupa vesikel kecil berukuran sekitar 50–120 nm, dan dikeluarkan melalui proses eksositosis. *Exosome* memiliki peran penting dalam komunikasi antar sel melalui pengangkutan molekul bioaktif seperti protein, asam nukleat (RNA dan DNA), lipid, metabolit, mikroRNA yang berperan dalam komunikasi antar sel.²⁴ Karena *exosome* mencerminkan kandungan sel asalnya, ia dijuluki sebagai “miniatur sel” yang membawa informasi biologis spesifik.



Gambar 2.6. Biogenesis dan komposisi *Exosome*²⁵

Biogenesis *exosome* terjadi melalui jalur endosomal, dimulai dari proses endositosis yang membentuk *early sorting endosome*, diikuti dengan penggabungan muatan dari kompleks Golgi pada tahap *late endosome*, hingga terbentuknya *multivesicular bodies* (MVBs) yang akhirnya dilepaskan ke lingkungan ekstraseluler melalui mekanisme eksositosis. *Exosome* ini dapat dikenali berdasarkan penanda permukaan tertentu seperti CD63, CD81, dan CD9.²⁵

Exosome dari sel punca (*stem cell-derived exosomes*) kini menjadi perhatian dalam bidang terapi regeneratif karena memiliki efek serupa dengan sel punca itu sendiri, namun tanpa risiko tumorigenik, imunogenik, atau permasalahan etis yang biasanya menyertai terapi sel punca langsung.

Exosome telah terbukti mampu memodulasi berbagai jalur pensinyalan penting dalam proses penyembuhan dan regenerasi, seperti PTEN/PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B, TGF- β , HIF-1 α , Wnt/ β -catenin, MAPK, JAK/STAT, Hippo, dan Notch. Jalur-jalur ini terlibat dalam berbagai mekanisme biologis seperti proliferasi, anti-inflamasi, angiogenesis, respon terhadap stres oksidatif, serta diferensiasi dan migrasi sel. Oleh karena itu, *exosome* berpotensi besar diterapkan dalam terapi berbagai penyakit degeneratif seperti osteoarthritis, stroke iskemik, luka kronis, penyakit jantung iskemik, hingga fibrosis hati dan kulit.²⁵

Kemampuan *exosome* dalam membawa muatan fungsional yang stabil, serta keamanannya untuk penggunaan klinis, menjadikannya sebagai kandidat kuat dalam pengembangan terapi berbasis sel bebas (*cell-free therapy*). Dalam dunia medis estetik, *exosome* dianggap sebagai terapi sel bebas yang revolusioner karena mampu meniru efek terapeutik dari sel induknya, namun tanpa risiko imunogenik atau tumorigenik.

Exosome memiliki struktur membran lipid bilayer yang melindungi kandungan internalnya dari degradasi. Komponen utama *exosome* meliputi protein sitoplasmik seperti RAB protein yang membantu fusi eksosom dengan sel target, tetraspanin (CD63, CD81, CD9) yang berperan dalam transportasi *exosome*, *heat shock protein* (HSP60, HSP70, HSP90) yang membantu stabilitas *exosome* dan miRNA serta mRNA yang dapat memodulasi ekspresi gen di sel penerima.²⁶

Exosome berperan multifaset dalam regulasi pigmentasi kulit, baik secara langsung maupun tidak langsung. Salah satu mekanisme utamanya

adalah melalui penghambatan jalur melanogenesis. Kandungan mikroRNA seperti miR-145 dan miR-330-5p serta faktor pertumbuhan seperti TGF- β dalam *exosome* dapat menekan ekspresi MITF, yang merupakan faktor transkripsi utama dalam sintesis melanin.²⁷

Selain itu, *exosome* juga mampu menurunkan aktivitas enzim TYR, enzim kunci dalam pembentukan melanin dan menghambat transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit. *Exosome* juga memiliki efek antioksidan kuat, dengan membawa enzim seperti *Super Oxide Dismutase* (SOD) dan *Glutathione Peroxidase* (GPx) yang bekerja menghambat stres oksidatif akibat paparan sinar UV, mengurangi oksidasi tirosin, dan menekan produksi melanin berlebih.²⁷

Efek sinergis dari aktivitas molekuler ini menjadikan *exosome* sebagai kandidat potensial dalam terapi regeneratif dan kosmetik molekuler untuk penanganan hiperpigmentasi secara lebih fisiologis dan berkelanjutan. Peran *exosome* dalam estetika medis, terutama pada hiperpigmentasi yaitu dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa *exosome* dapat mengurangi produksi melanin melalui mekanisme berikut :²⁶

- *Exosome* dari sel punca amnion manusia (hAMSCs-Exos) mengandung miR-181a-5p dan miR-199a, yang menghambat ekspresi MITF, faktor utama dalam melanogenesis.
- *Exosome* dari tali pusat manusia menghambat sintesis melanin melalui aktivasi jalur ERK, yang mempercepat degradasi MITF.
- *Exosome* susu yang mengandung miR-2478 dapat menargetkan gen *Rap1a* melalui jalur Akt-GSK3 β , sehingga menekan produksi melanin.

2.5.2 *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs)

Pada MSC, kondisi hipoksia dapat mengaktifkan aktivitas imunomodulasi regulasi, metabolisme, pertumbuhan dan diferensiasi sel. Hipoksia merupakan kondisi dimana tidak terdapat pasokan oksigen ke jaringan, dampak negatif dari berbagai tipe sel yang terpapar hipoksia yang berkepanjangan dapat menyebabkan apoptosis sel. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa lingkungan hipoksia dapat mengakibatkan adhesi, proliferasi, dan pembaharuan dari MSCs. Lingkungan hipoksia menyebabkan sintesis molekul *Hypoxic Induce Factor* (HIF), yang membantu MSCs memproduksi lebih banyak sitokin.

2.5.3 Metode Isolasi *Exosome* MSC

Untuk mendapatkan *exosome* yang berkualitas tinggi, proses isolasi yang tepat sangat krusial. Dalam studi, *exosome* diisolasi dari media kultur sel lemak manusia (*adipose-derived MSCs*) menggunakan dua pendekatan utama: metode ultrasentrifugasi diferensial dan metode presipitasi berbasis kit komersial.²⁸

Metode ultrasentrifugasi melibatkan beberapa tahap pemisahan berdasarkan ukuran dan densitas partikel, dimulai dari kecepatan rendah untuk menghilangkan sel dan debris, hingga $100.000\times g$ untuk memisahkan *exosome*. Sementara itu, metode presipitasi menggunakan larutan khusus yang dapat mengendapkan *exosome* hanya dengan sentrifugasi ringan dan waktu inkubasi semalam, tanpa memerlukan alat canggih.

Penelitian ini menunjukkan bahwa metode presipitasi tanpa sentrifugasi tambahan menghasilkan *exosome* dengan kemurnian dan kuantitas tertinggi, disertai integritas membran yang lebih baik. *Exosome* yang dihasilkan juga dikonfirmasi dengan *Transmission Electron Microscopy* (TEM), *flow cytometry* untuk penanda permukaan seperti CD9 dan CD63, serta uji kandungan protein menggunakan BCA assay. Hasil ini menggarisbawahi pentingnya memilih metode isolasi yang efisien agar *exosome* yang diperoleh dapat digunakan secara optimal dalam aplikasi terapi regeneratif dan estetika, termasuk untuk perbaikan jaringan kulit dan penanganan hiperpigmentasi.²⁹

Isolasi *exosome* dari *mesenchymal stem cell* (MSC) adalah proses penting untuk mempelajari fungsi dan aplikasi terapinya. Beberapa metode isolasi telah dikembangkan untuk memastikan kemurnian dan integritas *exosome* yang diisolasi. Berikut adalah beberapa metode yang umum digunakan pertama *Ultracentrifugasi Diferensial*, yang paling umum digunakan untuk isolasi *exosome*.

Proses ini melibatkan beberapa tahap sentrifugasi pada kecepatan yang berbeda untuk menghilangkan sel, debris seluler, dan partikel-partikel yang lebih besar. Pertama, medium kultur disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk menghilangkan sel-sel dan debris besar. Supernatan kemudian disentrifugasi pada kecepatan lebih tinggi untuk mengendapkan mikrovesikel dan partikel yang lebih besar dari *exosome*. Akhirnya, supernatan disentrifugasi pada kecepatan sangat tinggi (100,000-120,000 x g) untuk mengendapkan *exosome*. *Pellet exosome*

kemudian dicuci dan disentrifugasi ulang untuk meningkatkan kemurnian.²⁸

Kedua, Ultrafiltrasi metode ini menggunakan membran filter dengan ukuran pori tertentu untuk memisahkan *exosome* berdasarkan ukuran. Medium kultur difiltrasi melalui membran untuk menghilangkan partikel yang lebih besar dan molekul kecil, sementara *exosome* tertahan di membran. Ultrafiltrasi sering digunakan sebagai langkah tambahan setelah ultrasentrifugasi untuk meningkatkan kemurnian *exosome*.²⁸

Ketiga, Kromatografi Afinitas metode ini memanfaatkan interaksi spesifik antara molekul di permukaan *exosome* dengan ligan yang terikat pada matriks kromatografi. Antibodi yang spesifik terhadap marker permukaan *exosome* seperti CD63, CD81, dan CD9 sering digunakan. Medium kultur dilewatkan melalui kolom yang mengandung ligan ini, sehingga *exosome* yang mengandung marker permukaan yang sesuai akan terperangkap dan kemudian dielusi.³⁰

Keempat, Presipitasi Polimer metode ini melibatkan penggunaan polimer, seperti *polyethylene glycol* (PEG), yang menginduksi presipitasi *exosome* dari medium kultur. Polimer ini ditambahkan ke medium kultur dan diinkubasi, kemudian campuran disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk mengendapkan *exosome*. Metode ini relatif cepat dan sederhana, namun bisa menghasilkan *exosome* dengan kemurnian yang lebih rendah dibandingkan metode lain.⁹

Kelima, Isolasi Berdasarkan Densitas metode ini melibatkan penggunaan gradien densitas, seperti *gradien sucrose* atau *iodixanol*,

untuk memisahkan *exosome* berdasarkan densitas mereka. Medium kultur ditempatkan pada gradien densitas dan disentrifugasi pada kecepatan tinggi. *Exosome* akan terpisah pada lapisan yang sesuai dengan densitas mereka, yang kemudian dapat diambil secara terpisah.⁹

Exosome adalah inovasi yang menjanjikan dalam estetika medis karena kemampuannya memperbaiki jaringan, menghambat penuaan dan mengurangi hiperpigmentasi. Dengan biokompatibilitas tinggi, imunogenisitas rendah, penetrasi jaringan baik, *exosome* dapat menjadi alternatif yang lebih aman dan efektif dibandingkan terapi konvensional.

2.6 Arbutin

Arbutin adalah agen pencerah kulit alami yang ditemukan pada berbagai spesies tanaman dari beberapa famili, seperti marjoram, cranberry, blueberry, dan beberapa jenis pir.³ Arbutin memiliki dua bentuk isomer, yaitu α -arbutin (4- *hydroxyphenyl- α -D-glucopyranoside*) dan β -arbutin (4-*hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside*). Kedua bentuk ini memiliki struktur kimia yang sama, namun konfigurasi rotasinya berbeda.³¹ β -arbutin umumnya diekstrak dari daun berbagai tanaman dan kulit buah, sementara α -arbutin tidak ditemukan secara alami, melainkan dapat dibiosintesis melalui enzim mikroba atau mikroorganisme.

Menariknya, α -arbutin jauh lebih efektif dalam menghambat aktivitas enzim *tyrosinase* dibandingkan arbutin alami. Di situs aktif TYR, ikatan glukosida α menunjukkan afinitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikatan glukosida β .³²

Saat ini banyak produk perawatan kulit yang menggunakan α -arbutin karena lebih stabil dan efektif untuk mencerahkan kulit. Karena struktur molekulnya, α -arbutin bekerja mirip dengan hidrokuinon, tetapi dengan efek samping yang jauh lebih ringan. Ia tidak menyebabkan iritasi berat atau toksisitas pada sel melanosit, dan tidak menimbulkan eksogen okronosis (penggelapan kulit jangka panjang yang bisa terjadi akibat penggunaan hidrokuinon).

Selain itu, α -arbutin cenderung tidak menyebabkan iritasi atau reaksi alergi, sehingga lebih aman dan lebih nyaman digunakan untuk berbagai jenis kulit, termasuk kulit sensitif. Bahan ini membantu melindungi kulit dari hiperpigmentasi akibat sinar matahari dan radikal bebas, tanpa membuat kulit jadi lebih sensitif terhadap sinar matahari.

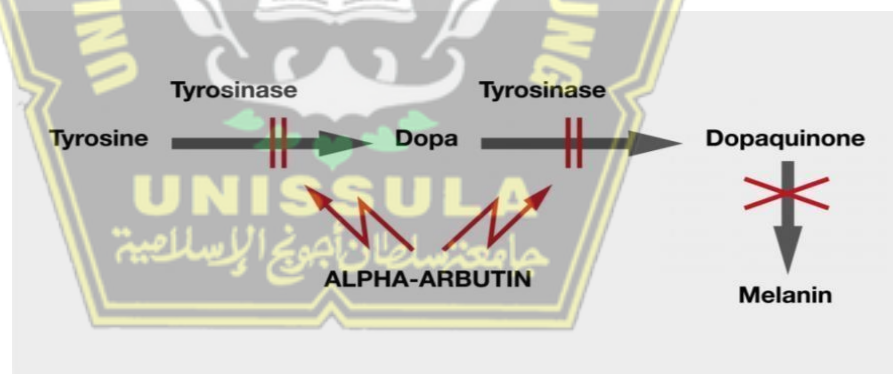
Dengan kata lain, α -arbutin mencerahkan warna kulit dengan menyamarkan noda gelap yang muncul akibat peradangan atau stres lingkungan. Menariknya lagi, α -arbutin juga membantu mengatasi efek glikasi yaitu proses yang disebabkan oleh kelebihan gula di kulit yang bisa menyebabkan kulit menguning dan kehilangan elastisitas.⁷

Berbeda dari bahan pencerah kulit lain yang menghentikan produksi enzim, arbutin bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim TYR di dalam melanosom, serta menekan aktivitas enzim lain yang berperan dalam pembentukan melanin, tanpa merusak sel kulit. Pada kondisi hiperpigmentasi kulit, di mana melanosit terlalu aktif, arbutin dapat digunakan sebagai krim topikal yang efektif untuk mengurangi noda gelap di kulit.

Bahkan, dalam sebuah uji klinis selama 12 minggu, penggunaan

deoksiarbutin secara topikal terbukti membantu mengurangi bintik hitam akibat paparan sinar matahari (*solar lentigines*), baik pada orang dengan kulit terang maupun gelap. Suatu studi menunjukkan bahwa arbutin dapat mengurangi aktivitas TYR secara bergantung pada dosis dalam melanosit manusia pada konsentrasi antara 0,1 hingga 1,0 mM tanpa menyebabkan penurunan viabilitas sel yang signifikan. Selain itu, efek penghambatan arbutin terhadap sintesis melanin dalam sel lebih kuat dibandingkan asam kojic atau asam L-askorbat pada konsentrasi tetap (0,5 mM).³³

Arbutin juga terbukti menghambat produksi melanin dalam sel B16 yang distimulasi oleh α -MSH serta meniadakan efek hiperpigmentasi akibat α -MSH pada kulit marmut coklat dan eksplan kulit manusia dalam eksperimen kultur organ.³³



Gambar 2.7. Mekanisme kerja alpha arbutin sebagai pencerah kulit³⁴

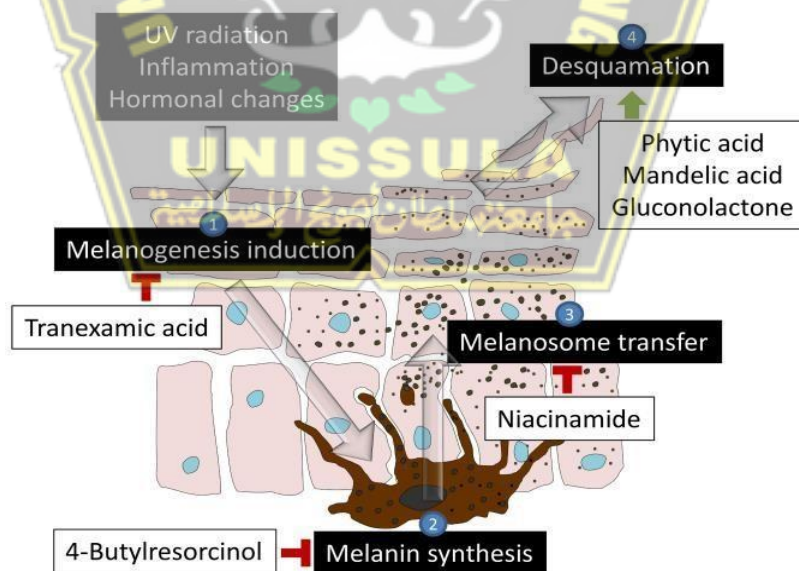
2.7 Niacinamide

Niacinamide adalah bentuk aktif secara biologis dari niacin (juga dikenal sebagai nikotinamida atau vitamin B3) yang banyak ditemukan pada umbi-umbian dan ragi. Senyawa ini merupakan prekursor dari NADH dan NADPH,

yaitu dua koenzim penting yang berperan dalam berbagai reaksi enzimatik di dalam sel.^{3, 35}

Peran penting niacinamide dalam aktivitas sel inilah yang menjadi dasar manfaatnya dalam berbagai produk kosmetik. Penelitian menunjukkan bahwa aplikasi niacinamide pada kultur gabungan melanosit dan keratinosit manusia dapat menghambat perpindahan melanosom (butiran pembawa melanin) dari melanosit ke keratinosit. Dengan kata lain, niacinamide mencegah pigmen melanin menyebar ke permukaan kulit, sehingga membantu mencerahkan kulit secara bertahap.³

Niacinamide tidak secara langsung menghambat aktivitas TYR atau produksi melanin dalam melanosit. Efek utama niacinamide dalam mencerahkan kulit terjadi melalui penghambatan transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit, yang mengurangi distribusi melanin di epidermis.⁸



Gambar 2.8. Mekanisme kerja niacinamide³⁵

Dalam uji klinis, penggunaan krim topikal yang mengandung niacinamide selama 4 minggu terbukti mengurangi bercak hiperpigmentasi dan meningkatkan kecerahan kulit, jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tak hanya itu, penelitian lain menemukan bahwa niacinamide memberikan perbaikan signifikan pada garis halus/kerutan, tekstur kulit, bintik hiperpigmentasi, dan kemerahan. Senyawa ini juga sangat ditoleransi dengan baik oleh kulit, dan dapat membantu mengurangi warna kekuningan kulit (*sallowness*) sehingga tampak lebih segar dan sehat.

Efektivitas dalam studi *in vitro*, niacinamide menunjukkan penghambatan transfer melanosom sebesar 35–68% dalam model kultur bersama melanosit dan keratinosit.²⁹ Selain itu, berbagai studi klinis juga mengamati adanya penurunan hiperpigmentasi yang signifikan serta peningkatan kecerahan kulit setelah penggunaan niacinamide dibandingkan dengan kontrol.

Dalam sebuah studi acak *double-blind* pada 18 wanita dengan hiperpigmentasi (*lentigo senilis*, *melasma*, atau *freckles*), penggunaan pelembap dengan 5% niacinamide secara signifikan lebih efektif dibandingkan dengan kontrol dalam mengurangi hiperpigmentasi dan meningkatkan kecerahan kulit setelah 4 minggu penggunaan.²⁹

Studi terbaru yang berlangsung selama 10 minggu pada lebih dari 200 wanita India dengan hiperpigmentasi epidermal pada wajah menunjukkan bahwa lotion yang mengandung niacinamide, panthenol, dan tocopheryl acetate memberikan perbaikan yang lebih baik pada hiperpigmentasi dan meratakan warna kulit dibandingkan dengan lotion kontrol.³⁶

Niacinamide dianggap sebagai agen pencerah kulit yang efektif dengan mekanisme unik, yaitu melalui penghambatan transfer melanosom. Berbeda dengan agen pencerah lainnya seperti hidrokuinon atau asam kojic, niacinamide memiliki keamanan yang lebih baik dan tidak menyebabkan efek samping seperti iritasi atau sensitivitas tinggi pada kulit.²⁹



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB merupakan salah satu pencetus utama terjadinya hiperpigmentasi kulit. UVB memicu peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), yaitu molekul reaktif yang menimbulkan stres oksidatif pada sel kulit. Peningkatan kadar ROS ini kemudian mengaktifasi ekspresi gen p53, protein penting yang bertugas sebagai “penjaga genom” namun juga memiliki peran dalam aktivasi jalur pigmentasi melalui stimulasi sistem sinyal cAMP.

Ekspresi p53 akan meningkatkan aktivitas *adenylate cyclase*, yang meningkatkan kadar cAMP (*cyclic AMP*) di dalam sel. Peningkatan cAMP mengaktifkan PKA (Protein Kinase A), yang merupakan enzim penting dalam fosforilasi protein target. Aktivasi PKA kemudian menstimulasi ekspresi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF), yang merupakan faktor transkripsi utama pengatur ekspresi enzim melanogenik seperti *Tyrosinase* (TYR).

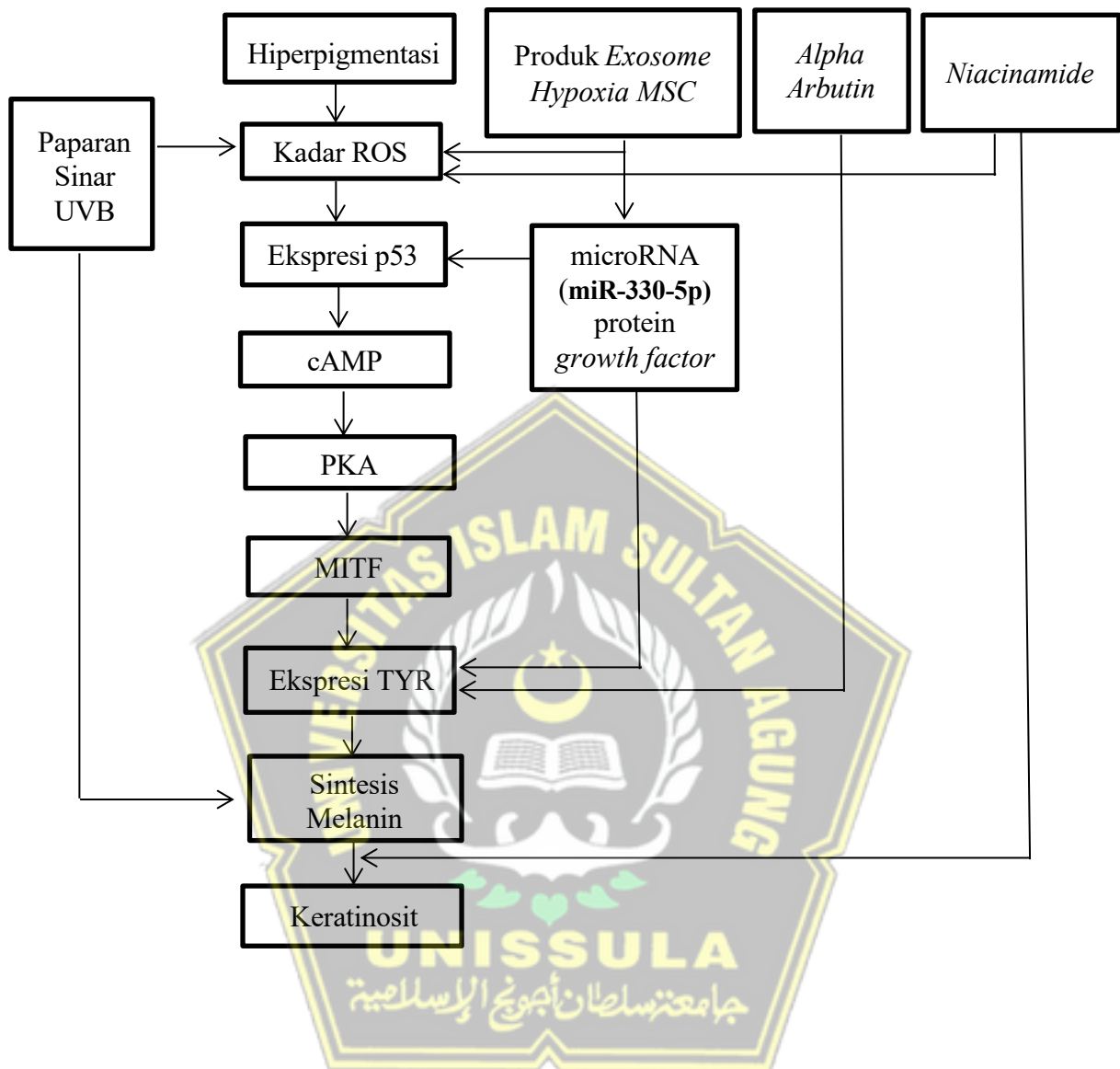
Ekspresi TYR akan mendorong sintesis melanin, yaitu pigmen utama penentu warna kulit. Melanin kemudian disintesis di dalam melanosom dan ditransfer ke keratinosit, menghasilkan perubahan warna kulit yang tampak sebagai hiperpigmentasi.

Kombinasi EH-MSCs, alpha arbutin, dan niacinamide berpotensi mempengaruhi ekspresi gen p53 dan TYR yang berperan penting dalam

regulasi siklus sel dan produksi melanin. EH-MSCs adalah *exosome* yang berasal dari MSCs yang dikondisikan dalam kondisi hipoksia mengandung berbagai molekul bioaktif, termasuk *microRNA* (miRNA), protein, dan faktor pertumbuhan. Peran miRNA yang mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam jalur melanogenesis, baik dengan menekan ekspresi MITF (miR-145) maupun TYR (miR-330-5p), atau justru memperkuatnya tergantung jenis microRNA yang terlibat.

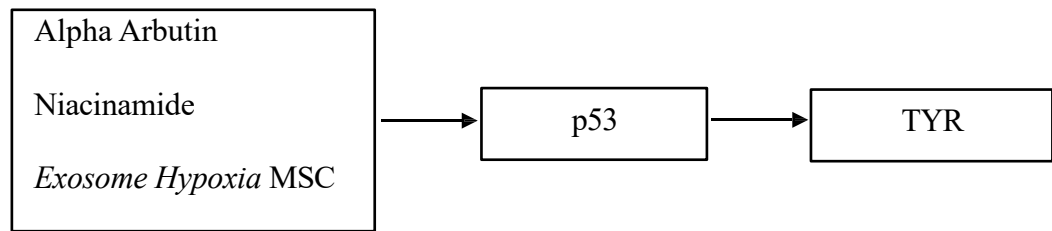
Alpha arbutin dikenal sebagai inhibitor kompetitif enzim *tyrosinase*, yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis melanin. Dengan menghambat aktivitas *tyrosinase*, alpha arbutin efektif dalam mengurangi produksi melanin dan hiperpigmentasi.

Niacinamide, atau vitamin B3, memiliki efek dalam menghambat transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit, sehingga mengurangi distribusi melanin di epidermis. Beberapa studi menunjukkan bahwa niacinamide dapat mempengaruhi jalur sinyal yang berhubungan dengan stres oksidatif dan dapat memodulasi aktivitas protein seperti p53, meskipun mekanisme pastinya masih dalam penelitian.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

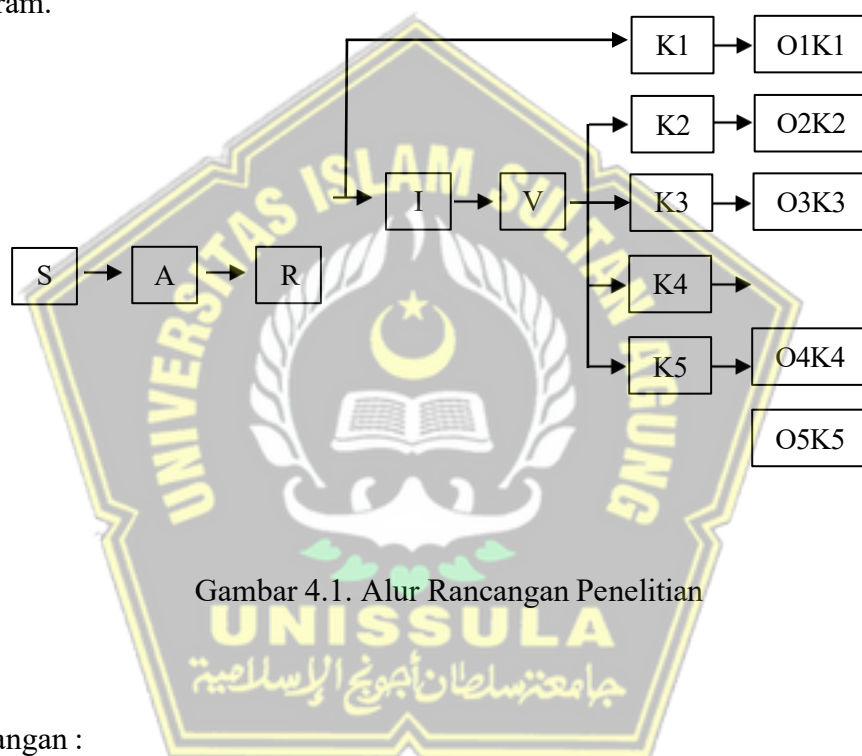
Terdapat pengaruh pemberian kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 μ l, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi gen p53 dan ekspresi *Tyrosinase* (TYR) pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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



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 paparan UVB diberi NaCl 0,9%)

K3 : Kontrol Positif (Mencit terpapar UVB diberi alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram)

K4 : Perlakuan 1 (Mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi *exosome* 200µl)

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 µl)

O1K1 : Observasi ekspresi gen p53 dan TYR kelompok K1

O2K2 : Observasi ekspresi gen p53 dan TYR kelompok K2

O3K3 : Observasi ekspresi gen p53 dan TYR kelompok K3

O4K4 : Observasi ekspresi gen p53 dan TYR kelompok K4

O5K5 : Observasi ekspresi gen p53 dan TYR kelompok K5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Injeksi *exosome* 200 µl dan topikal alpha arbutin 5% dengan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram

4.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen p53 dan TYR

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. EH-MSC

Exosome adalah vesikel kecil yang mengandung materi genetik dan protein, yang dilepaskan oleh sel dan berfungsi sebagai perantara komunikasi antar sel. Injeksi *exosome* terbagi dalam beberapa kelompok yaitu Kelompok 4 (mencit dengan paparan UVB dan pemberian injeksi *exosome* 200 µl) dan Kelompok 5 (mencit dengan paparan UVB dan pemberian topikal alpha arbutin 5% , niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram dan perlakuan injeksi *exosome* 200 µl.

Skala : Rasio

4.2.2.2. Ekspresi gen p53

Ekspresi gen p53 merujuk pada tingkat keberadaan protein p53 yang dihasilkan oleh sel sebagai respons terhadap stres oksidatif atau kerusakan DNA, khususnya yang diinduksi oleh paparan sinar UVB. Gen p53 dianalisis menggunakan qRT-PCR.

Skala: rasio

4.2.2.3. Ekspresi TYR

Ekspresi TYR adalah konsentrasi yang diproduksi oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. TYR dianalisis menggunakan qRT-PCR.

Skala: rasio

4.2.2.4. Alpha Arbutin dan Niacinamide

Alpha arbutin dan niacinamide adalah terapi *gold* standar berupa sediaan topikal terbagi dalam beberapa kelompok yaitu kontrol positif (mencit dengan paparan UVB dan perlakuan topikal alpha arbutin 5% dan

niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram) dan perlakuan 2 (mencit dengan paparan UVB dan perlakuan topikal alpha arbutin 5%, niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram dan perlakuan injeksi *exosome* 200µl). Skala: rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1 Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah mencit jantan galur C57BL/6 berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 20-25 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia.

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah mencit C57BL/6 yang diberi paparan UVB 180mj/cm².

4.3.1.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut:

- a. Mencit jantan galur C57BL/6
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Berat badan 20-25 gram
- d. Tidak memiliki luka, kelainan kulit, atau penyakit sistemik

4.3.1.2. Kriteria Eksklusi

Mencit jantan galur C57BL/6 dengan kriteria:

- a. Kondisi sakit, infeksi, stress berat selama masa adaptasi
- b. Perubahan perilaku
- c. Perubahan berat badan $> 20\%$

4.3.1.3. Kriteria *Drop Out*

Mencit yang masuk kriteria *drop out* pada penelitian ini adalah mencit mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3 Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan 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 dengan paparan 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 EH-MSCs 200 μ l, 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 EH-MSCs 200 μ l.

4.3.4 Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung berdasarkan sampel eksperimental dari Federer. Rumus Federer yaitu : $(t-1)(n-1) \geq 15$. Dengan jumlah kelompok (nilai t) sebanyak 5, maka diperoleh nilai minimum $n = 5$ ekor per kelompok. Untuk mengantisipasi kemungkinan kehilangan sampel, ditambahkan 1 ekor cadangan pada setiap kelompok, sehingga jumlahnya menjadi 6 ekor per kelompok. Dengan demikian, total mencit yang

digunakan adalah 30 ekor yang dibagi secara acak ke dalam 5 kelompok perlakuan. Selain itu, ditambahkan 4 ekor mencit sebagai kelompok validasi (sehat dan sakit), sehingga keseluruhan jumlah sampel dalam penelitian ini adalah 34 ekor.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain, UV chamber. Alat lain yang digunakan adalah kandang pemeliharaan, *clipper*, timbangan digital, spatula, spuit 1 cc, needle 30G, *Bio Safety Cabinet*, *flowcytometer*, mikroskop *inverted*, mikropipet, tabung *centrifuge*, pelat kultur sel, botol beher, shaker, pH meter, *autoclave* dan lampu UV.

4.4.2 Bahan

Bahan yang dipakai dalam penelitian meliputi bahan untuk perlakuan yang terdiri dari NaCl 0,9%, sediaan cream alpha arbutin 5%, sediaan cream niacinamide 4% dan EH-MSCs 200 µl. Selain itu, digunakan pula bahan pendukung untuk analisis molekuler, antara lain reagen ekstraksi RNA, enzim *reverse transcriptase* untuk sintesis cDNA, serta *master mix* PCR lengkap dengan primer spesifik untuk gen target (*p53* dan *TYR*) maupun gen housekeeping sebagai kontrol internal. Untuk pemeliharaan mencit, disediakan pakan standar laboratorium dan air minum *ad libitum*. Validasi melanin dengan pewarnaan histologis 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 *Exosome Hypoxia* MSC diperoleh dari SCCR yang sudah mengalami proses validasi MSCs dan EH-MSCs. Produk sudah dalam bentuk siap pakai sebanyak 1,5 ml untuk pemberian perlakuan pada subjek penelitian.

4.5.3 Pemaparan Hiperpigmentasi

- a. Mencit di adaptasikan selama 5 hari
- b. Rambut pada bagian punggung mencit dicukur dengan *clipper* hingga bersih
- c. Punggung mencit yang telah dicukur seluas 5x5 cm iradiasi dengan UVB *light* (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan 180 mJ/cm² sebanyak 3 kali seminggu (hari 1, 3, dan 5) 10 menit selama 2 minggu

4.5.4 Pemberian Perlakuan pada Subjek Penelitian

Setelah pemaparan UVB selama 2 minggu, dilakukan validasi hiperpigmentasi terlebih dahulu. Selanjutnya mencit diberikan perlakuan sesuai kelompoknya. Mencit kontrol negatif (K2) diberikan NaCl 0,9%, mencit kontrol positif (K3) diberikan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram selama 7 hari, mencit kelompok 4 (K4) diberikan injeksi EH-MSCs 200 µl sebanyak 2x di hari

ke-1 dan di hari ke-4 perlakuan, mencit kelompok 5 (K5) diberikan injeksi *exosome* 200 μ l sebanyak 2x di hari ke-1 dan di hari ke-4 perlakuan dan kombinasi dengan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram selama 7 hari .

4.5.5 Terminasi dan Pengambilan Jaringan

Terminasi mencit dengan cara dislokasi servikalis. Setelah mencit mati, dilakukan koleksi organ kulit kemudian disimpan dalam *cryotube* yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later.

4.5.6 Prosedur Pembuatan Preparat dan Pembacaan Hiperpigmentasi

Jaringan kulit yang telah diambil terlebih dahulu difiksasi menggunakan larutan formalin 10% kemudian diproses menjadi blok parafin. Preparat histologi selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan metode Masson-Fontana untuk menilai distribusi melanin pada jaringan kulit.

Ketebalan epidermis, mulai dari lapisan basal hingga stratum korneum, diukur menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan mikrometer okuler. Analisis ketebalan jaringan kemudian dilanjutkan dengan perangkat lunak ImageJ untuk memperoleh hasil pengukuran yang lebih akurat. Data yang diperoleh dari setiap kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol serta kelompok mencit sehat sebagai acuan.

4.5.7 Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA

Sampel jaringan kulit difiksasi dengan formalin 10% kemudian diproses menjadi blok parafin. Dari jaringan yang disimpan dalam RNA later sebanyak ± 100 mg, diambil potongan kecil dan dimasukkan ke dalam tabung berisi 50 μ l RNA Iso Plus. Potongan jaringan selanjutnya dihancurkan

menggunakan mikropestle, kemudian ditambahkan kembali RNA Iso Plus dengan volume yang sama dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 20 µl kloroform, divorteks hingga campuran tampak homogen dengan warna putih susu, lalu diinkubasi 2–3 menit sebelum disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C.

Hasil sentrifugasi menghasilkan tiga lapisan, yaitu lapisan atas yang mengandung RNA (fase cair), lapisan tengah berisi DNA (fase semi padat), dan lapisan bawah berupa debris seluler. Lapisan atas diambil hati-hati, kemudian dicampur dengan isopropanol dalam volume yang sama untuk mengendapkan RNA. Endapan RNA yang berbentuk serabut putih kemudian disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C.

Supernatan dibuang, sedangkan pellet RNA dicuci dengan 100 µl etanol 70% dalam larutan DEPC, lalu disentrifugasi ulang dengan kondisi yang sama. Setelah supernatan dibuang dan pellet dikeringkan, ditambahkan 30–50 µl DEPC dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit. RNA total yang diperoleh disimpan pada suhu -80 °C dan konsentrasinya diukur menggunakan Nanodrop, lalu disetarakan hingga 3000 ng untuk proses selanjutnya.

Sintesis cDNA dilakukan dengan menyiapkan Campuran A yang terdiri dari RNA hasil kuantifikasi, 1 µl oligo-dT, serta PCR grade water hingga volume akhir 10 µl. Campuran ini diinkubasi pada suhu 70 °C selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan Campuran B yang mengandung 5X buffer (4 µl), DEPC-treated H₂O (5 µl), serta enzim ReverTra Ace (1 µl). Proses

sintesis cDNA dilakukan dengan tahapan inkubasi pada suhu 25 °C selama 5 menit, 42 °C selama 50 menit, dan 85 °C selama 5 menit.

4.5.8 Analisis Ekspresi Gen dengan *Real-Time* PCR (RT-PCR)

Ekspresi mRNA gen *p53* dan *TYR* dianalisis menggunakan teknik RT-PCR. Reaksi PCR untuk *p53* disusun dari 3 µl cDNA, 12,5 µl Taq Master Mix (mengandung dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer, dan MgCl₂), primer forward 5'-ATGACAGACCTTCCTGAGCA-3' dan reverse 5'-CTCCTTGGGACTTGGCTTTG-3' masing-masing 0,6 µl, serta 8,3 µl Nuclease-Free Water.

Sementara itu, untuk gen *TYR*, digunakan primer forward 5'-GTTCAGAGCGGAGAAAGCATT-TG-3' dan reverse 5'-CACATCTGCAAG-TACGTTCGTTT-3' dengan komposisi reaksi yang sama. Sebagai kontrol internal, digunakan gen *GAPDH* dengan primer forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGAGTC-3' dan reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'.

Produk PCR kemudian dianalisis menggunakan sistem qRT-PCR Illumina. Data ekspresi gen diolah menggunakan perangkat lunak EcoStudy dengan metode perbandingan relatif terhadap gen housekeeping ($\Delta\Delta Ct$).

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

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

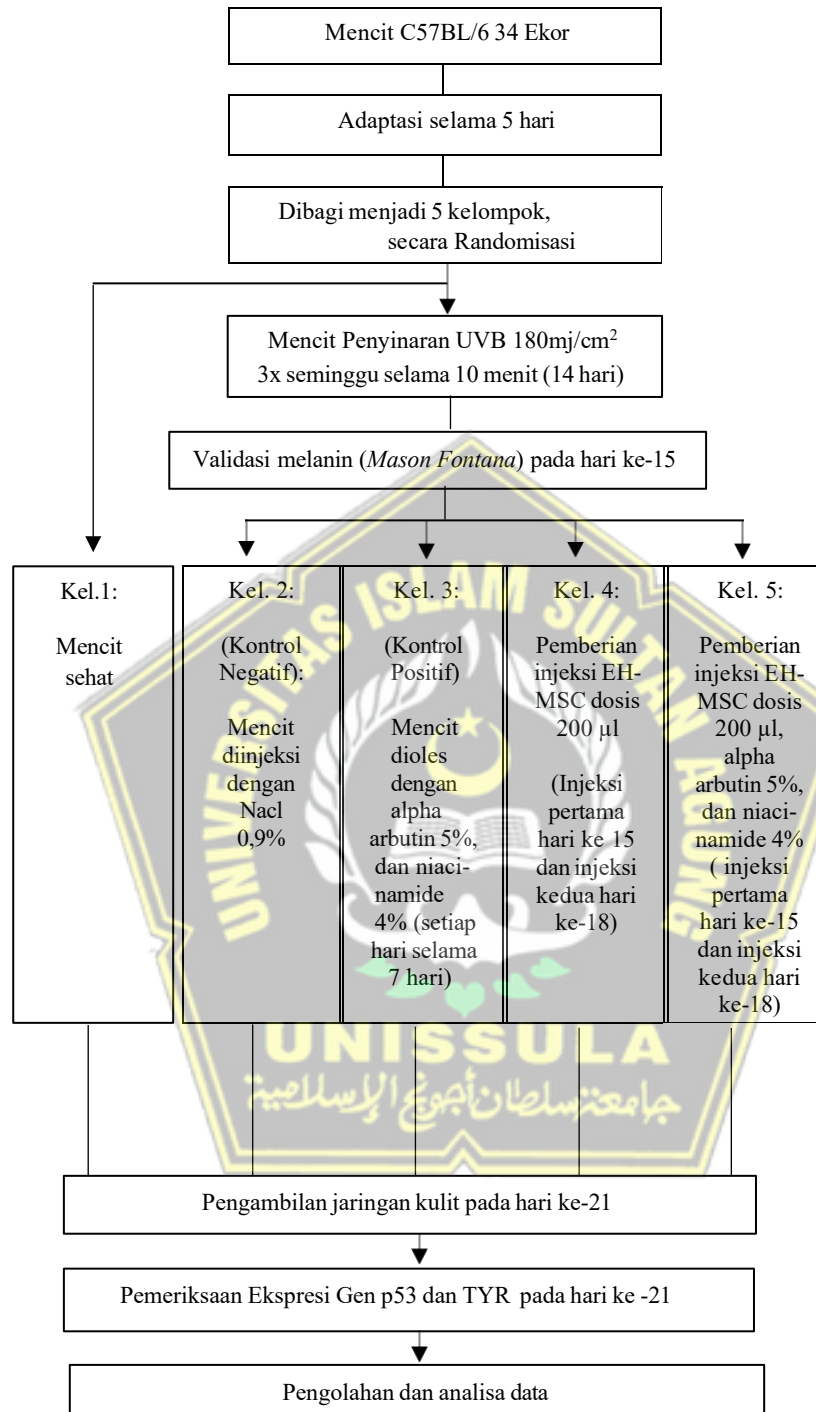
4.7. Analisa Data

Selanjutnya, dilakukan analisis normalitas data menggunakan uji

Shapiro Wilk. Dari hasil analisis menunjukkan distribusi data tidak normal ($p < 0,05$), maka uji *One-Way* ANOVA tidak bisa dilaksanakan karena tidak memenuhi syarat uji parametrik. Sehingga analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu Kruskal Wallis. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian, baik ekspresi gen p53 maupun ekspresi TYR. Setelah uji Kruskal Wallis, dilanjutkan uji Mann Whitney untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Didapatkan nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

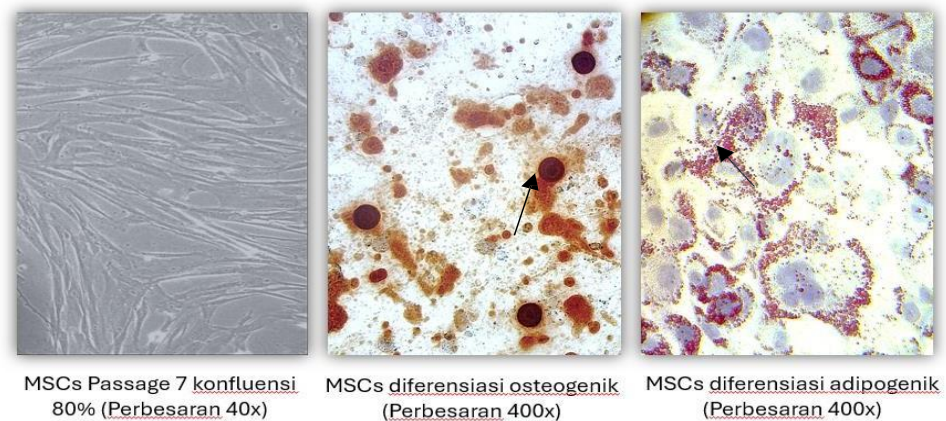
5.1. Hasil Penelitian

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

Karakterisasi MSC dalam penelitian ini bertujuan untuk memastikan bahwa sel yang digunakan benar-benar merupakan sel punca mesenkimal, yang memiliki sifat multipoten untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel jaringan, seperti tulang (osteoblas) dan lemak (adiposit). MSC diisolasi di Laboratorium SCCR Semarang, menggunakan sumber berupa tali pusat mencit berusia 21 hari kehamilan.

Setelah mencapai *passage* ke-7, dengan tingkat konfluensi mencapai 80%, dan diamati dengan pembesaran 40x menunjukkan morfologi fibroblastik memanjang menyerupai *spindle* dan pertumbuhan sel yang homogen. Hal ini menunjukkan bahwa sel-sel yang digunakan merupakan MSC yang stabil tanpa kontaminasi sel non-MSC.

Kemampuan diferensiasi MSC dikonfirmasi melalui induksi kedua jalur diferensiasi utama, yaitu adipogenik dan osteogenik. Diferensiasi ini merupakan metode validasi fungsional untuk membuktikan multipotensi MSC. Diferensiasi adipogenik terlihat pada pembesaran 400x berupa droplet lipid yang terwarnai dengan Oil Red O, sebagai bukti bahwa sel MSC mampu berdiferensiasi menjadi adiposit. Sedangkan diferensiasi osteogenik juga terlihat pada pembesaran 400x tampak deposit kalsium yang mengindikasikan pembentukan matriks tulang. Umumnya ditandai dengan pewarnaan Alizarin Red.



Gambar 5.1 Diferensiasi MSCs

Hasil uji menunjukkan bahwa MSC yang digunakan memenuhi tiga kriteria utama MSC menurut *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), yaitu beradhesi pada permukaan plastik, menunjukkan ekspresi marker permukaan spesifik MSC dan memiliki kemampuan diferensiasi menjadi adiposit, osteoblas, dan kondrosit.

Validasi karakter dan diferensiasi MSC penting untuk mendukung penggunaan *exosome* MSC sebagai agen terapi dalam model hiperpigmentasi kulit. Karena hanya MSC yang tervalidasi dengan baik yang menghasilkan *exosome* dengan profil protein, RNA, dan aktivitas biologis yang tepat. Dengan adanya validasi diferensiasi ini, dapat dipastikan bahwa *exosome* yang digunakan berasal dari MSC dengan multipotensi aktif dan bukan dari sel lain yang mungkin menghasilkan partikel serupa, serta valid untuk digunakan sebagai sumber *exosome* dalam penelitian ini. Karakterisasi fenotipik MSC dilakukan menggunakan metode *flow cytometry* untuk mengevaluasi ekspresi penanda permukaan spesifik. Hasil analisis menunjukkan bahwa sel-sel pada *passage* ke-7 memiliki profil ekspresi marker sebagai berikut :

- **CD45 (FITC-A): 0.51%**

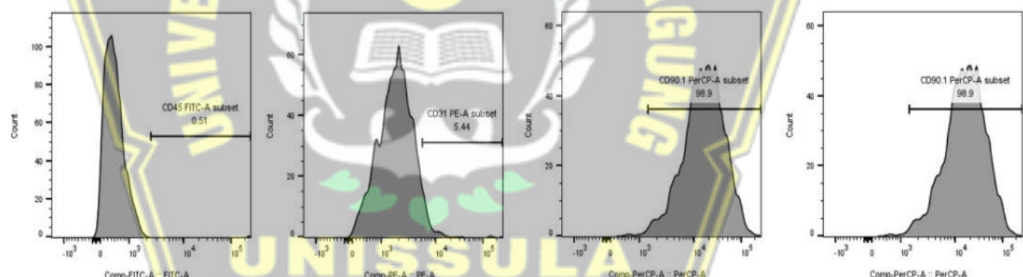
Merupakan penanda sel hematopoietik (leukosit). Rendahnya ekspresi ini menunjukkan bahwa sel yang digunakan bukan berasal dari garis keturunan hematopoietik, mendukung spesifisitas MSC.

- **CD31 (PE-A): 5.44%**

Merupakan penanda endotelial. Persentase rendah menunjukkan minimnya kontaminasi oleh sel endotel, yang penting dalam menjaga kemurnian populasi MSC.

- **CD90 (PerCP-A): 98.9%**

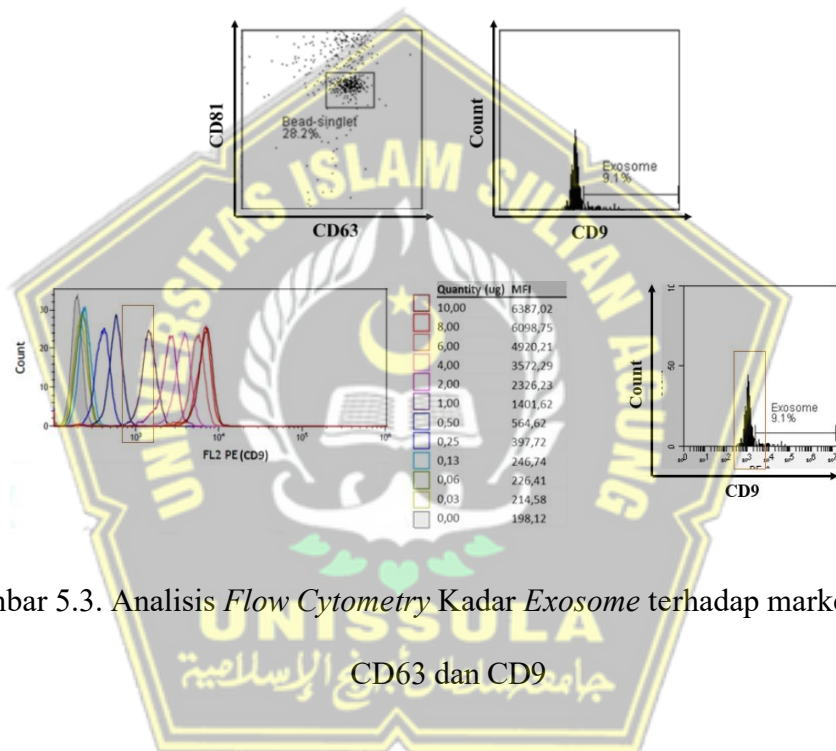
Merupakan marker positif utama untuk MSC. Tingginya ekspresi ini menunjukkan bahwa mayoritas populasi sel memiliki identitas MSC yang jelas.



Gambar 5.2 Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD45, CD31 CD90

Berdasarkan gambar 5.2 dapat disimpulkan bahwa populasi sel yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi kriteria fenotipik MSC yang ditetapkan secara Internasional, dengan ekspresi tinggi pada penanda MSC yaitu CD90 (98,9%) dan ekspresi sangat rendah pada penanda non-MSC, yaitu CD45 (0,51%) dan CD31(5,44%). Hal ini menunjukkan bahwa sel telah terkarakterisasi secara baik sebagai MSC yang homogen dan layak digunakan sebagai sumber *exosome* dalam penelitian ini

Setelah tervalidasi, MSC kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam menggunakan box hipoksia. Setelah itu, medium kultur MSC yang mengandung *secretome* MSC dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode TFF dengan ukuran 100-500 kDa sehingga dapat diperoleh EH-MSC. Setelah diisolasi, kadar *exosome* dianalisis menggunakan metode *flow cytometry* dan didapatkan bahwa kadar *exosome* yang didapatkan sebesar 0.75 µg/100 uL atau sebesar 7.5 µg/mL.



Gambar 5.3. Analisis *Flow Cytometry* Kadar *Exosome* terhadap marker CD81, CD63 dan CD9

5.1.2. Hasil Validasi Hiperpigmentasi

Validasi keberhasilan pembentukan model hiperpigmentasi pada mencit C57BL/6 dalam penelitian ini dibuktikan melalui observasi makroskopis dan mikroskopis dengan membandingkan kondisi kulit mencit sehat dan mencit yang diinduksi paparan UVB. Secara makroskopis pada gambar 5.4, kulit mencit sehat tampak berwarna merah muda pucat dengan permukaan halus, tanpa tanda

hiperpigmentasi maupun kerusakan struktur epidermis, menandakan bahwa proses melanogenesis belum teraktivasi.

Sebaliknya, pada mencit yang terpapar UVB terlihat adanya perubahan warna kulit menjadi lebih gelap dan merata pada area perlakuan, disertai permukaan kulit yang tampak lebih keriput. Perubahan ini mengindikasikan terjadinya peningkatan deposisi melanin sebagai mekanisme adaptif terhadap stres akibat paparan sinar UVB.



Sebelum paparan UVB



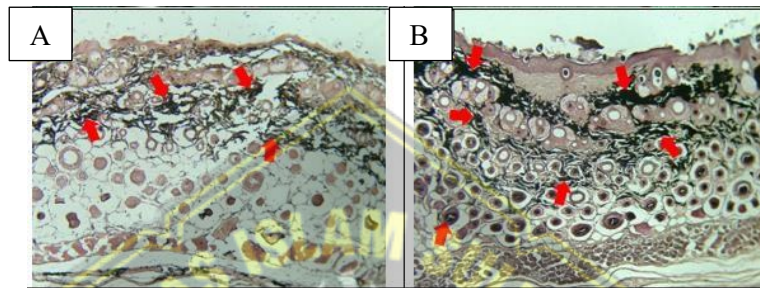
Setelah paparan UVB

Gambar 5.4. Makroskopis kulit punggung mencit C57BL/6

Secara mikroskopis yang terlihat pada gambar 5.5, lesi kulit pada mencit C57BL/6 yang diinduksi UVB menunjukkan bercak berwarna coklat kehitaman dengan batas yang kurang tegas dan distribusi pigmentasi sentral yang menyebar, berbeda dengan kondisi kulit kelompok sehat yang tampak normal.

Pemeriksaan histologis memperlihatkan epidermis dan dermis yang sarat dengan granula melanin, batas antara epidermis dan dermis yang tidak jelas, serta adanya tanda pencairan dan degenerasi pada sel basal. Di dermis ditemukan melanofag berbentuk fusiform, disertai proliferasi kolagen dengan pola susunan yang rapat.

Hasil pewarnaan Masson-Fontana memperkuat temuan ini, di mana granula melanin terdistribusi di seluruh lapisan epidermis dan jumlahnya secara signifikan lebih banyak dibandingkan kelompok sehat. Secara keseluruhan, analisis makroskopis, mikroskopis, dan kuantifikasi kandungan melanin mengonfirmasi bahwa paparan UVB secara signifikan meningkatkan deposisi melanin dibandingkan kondisi kulit sehat.



Gambar 5.5. Validasi Hiperpigmentasi dengan Masson Fontana

Setelah mencit tervalidasi mengalami hiperpigmentasi, mencit yang tanpa induksi UVB digunakan sebagai kelompok sehat (K1), sedangkan mencit yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi UVB dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara acak yaitu K2 (diberikan injeksi NaCl 0,9%), K3 (diberikan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram), K4 (diberikan injeksi EH- MSC 200 μ l), K5 (diberikan kombinasi injeksi EH- MSC 200 μ l dan topikal alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4%). Injeksi EH-MSC diberikan 2x pada hari ke-1 dan ke- 4 setelah mencit divalidasi mengalami hiperpigmentasi. Pemberian topikal alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% setiap hari selama 7 hari. Lalu dilakukan pengambilan sampel jaringan pada hari ke 7.

Mencit diterminasi menggunakan metode dislokasi servikalis, kemudian

jaringan kulit segera dikoleksi dan dimasukkan ke dalam cryotube bebas RNAase yang berisi RNAlater. Sampel disimpan pada suhu -80°C hingga tahap analisis. Untuk proses ekstraksi protein dan RNA, jaringan kulit dihomogenisasi menggunakan RIPA buffer yang telah ditambahkan *protease inhibitor* guna mencegah degradasi protein. Proses homogenisasi dilakukan hingga jaringan berubah menjadi suspensi homogen, kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan dan durasi yang sesuai protokol.

Hasil sentrifugasi menghasilkan fraksi supernatan yang berisi komponen target, yang kemudian dikumpulkan secara hati-hati untuk selanjutnya dianalisis. Analisis ekspresi gen p53 dan TYR dilakukan menggunakan metode *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR), dengan tujuan mengukur tingkat transkripsi kedua gen tersebut secara kuantitatif sebagai indikator respons biologis terhadap perlakuan yang diberikan.

5.1.3. Hasil Pemeriksaan Ekspresi Gen p53

Hasil analisis rata-rata ekspresi gen p53 pada masing-masing kelompok subyek penelitian ditunjukkan sebagai berikut :

Tabel 5.1 Ekspresi Gen p53

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	<i>P value</i>
Ekspresi p53						
Mean	0,99	0,70	0,55	0,15	0,27	
SD	$\pm 0,05$	$\pm 0,25$	$\pm 0,28$	$\pm 0,11$	$\pm 0,72$	
<i>Shapiro Wilk</i>	0,291	0,227	0,478	0,025	0,352	
<i>Kruskal Wallis</i>						0,00

Keterangan : * *Shapiro Wilk* = Normal ($p > 0,05$)
 * *Kruskal Wallis* = Signifikan ($P < 0,05$)

Berdasarkan hasil analisis ekspresi gen p53 yang disajikan pada Tabel 5.1 terlihat adanya perbedaan tingkat ekspresi antar kelompok perlakuan. Kelompok sehat (K1) menunjukkan nilai rata-rata tertinggi ($0,99 \pm 0,05$), sedangkan kelompok yang menerima paparan UVB dengan pemberian injeksi EH-MSCs (K4) memiliki nilai terendah ($0,15 \pm 0,11$). Pada kelompok kontrol negatif (K2), yang mendapatkan paparan UVB dan injeksi NaCl, rata-rata ekspresi p53 menjadi $0,70 \pm 0,25$ dibandingkan K1. Penurunan ini terjadi juga pada kelompok K3 dan K5 yang masing-masing menunjukkan nilai rata-rata $0,55 \pm 0,28$ dan $0,27 \pm 0,72$.

Uji normalitas *Shapiro Wilk* menunjukkan bahwa sebagian besar kelompok memiliki data yang tidak berdistribusi normal. Sehingga analisis tidak dapat dilanjutkan menggunakan uji parametrik karena tidak memenuhi syarat, sehingga dilakukan uji non parametrik yaitu *Kruskal Wallis* yang menunjukkan adanya perbedaan bermakna (signifikan) terhadap ekspresi gen p53 antar kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar pasangan kelompok.

Tabel 5.2 Hasil Uji *Mann Whitney* gen p53

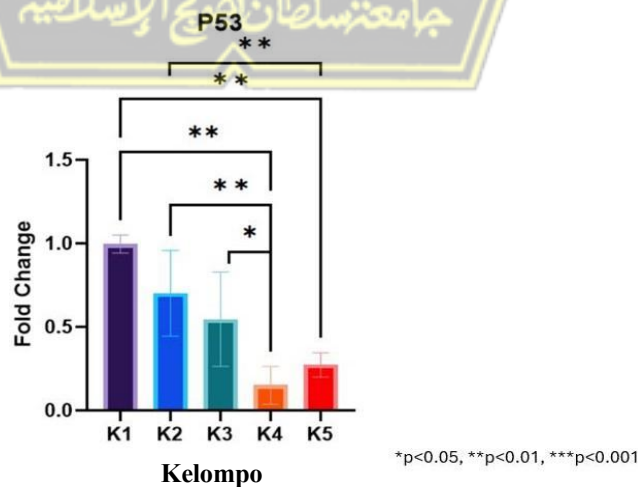
Kelompok	Kelompok Perbandingan	<i>p(value)</i>
K1	K2	0,055
	K3	0,006
	K4	0,004
	K5	0,004
K2	K3	0,470
	K4	0,004
	K5	0,004
K3	K4	0,025
	K5	0,172
K4	K5	0,108

Keterangan : ada perbedaan bermakna jika $p < 0,05$

Hasil uji Mann Whitney yang ditampilkan pada Tabel 5.2 menunjukkan adanya perbedaan bermakna ekspresi gen p53 pada beberapa pasangan kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Perbandingan antara K1 dengan K3, K4 dan K5 menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan, masing-masing secara berurutan $p = 0,006$; $p = 0,004$; dan $p = 0,004$. Perbandingan K1 dengan K2 menghasilkan $p = 0,055$ yang berada sedikit di atas ambang signifikansi 0,05.

Selain itu, K2 berbeda signifikan dengan K4 dan K5 ($p = 0,004$ untuk keduanya), yang menunjukkan bahwa perlakuan pada K4 dan K5 menyebabkan penurunan ekspresi p53 yang lebih besar dibandingkan K2. Perbedaan signifikan juga ditemukan pada perbandingan K3 dengan K4 ($p = 0,025$) yang menandakan bahwa perlakuan pada K4 memiliki efek penurunan p53 lebih bermakna dibanding K3.

Tidak ditemukan perbedaan signifikan antara K2 dengan K3 ($p = 0,470$), K3 dengan K5 ($p = 0,172$), maupun K4 dengan K5 ($p = 0,108$) yang mengindikasikan bahwa pada pasangan-pasangan tersebut tingkat ekspresi p53 relatif sebanding.



Gambar 5.6 Grafik Ekspresi Relatif Gen p53

Berdasarkan gambar 5.6 menunjukkan kelompok sehat (K1) memiliki nilai *fold change* mendekati 1 yang merepresentasikan kondisi basal ekspresi p53 pada kulit normal tanpa paparan UVB. Dari grafik tersebut juga menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok K1 dengan K4 dan K5 dengan nilai rata-rata *fold change* secara berurutan adalah 0,99 ; 0,15 ; 0,27.

Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok K2 dengan K4 dan K5 dengan nilai rata-rata *fold change* secara berurutan adalah 0,70 ; 0,15 ; 0,27. Dan terdapat perbedaan signifikan antara K3 dan K4 dengan nilai rata-rata *fold change* 0,55 dan 0,15.

5.1.4 Hasil Pemeriksaan Ekspresi TYR

Hasil analisis rata-rata ekspresi TYR pada masing-masing kelompok subyek penelitian ditunjukkan sebagai berikut :

Tabel 5.3 Ekspresi Gen TYR

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	<i>P value</i>
Ekspresi TYR						
Mean	0,98	0,92	0,87	0,54	0,61	
SD	±0,47	±0,21	±0,31	±0,24	±0,16	
<i>Shapiro Wilk</i>	0,134	0,001	0,534	0,047	0,764	
<i>Kruskal Wallis</i>						0,006

Keterangan : **Shapiro Wilk* = Normal ($P > 0,05$)

* *Kruskal Wallis* = Signifikan ($P < 0,05$)

Berdasarkan hasil analisis yang ditampilkan pada Tabel 5.3, ekspresi gen TYR menunjukkan variasi antar kelompok perlakuan. Kelompok sehat (K1) memiliki nilai rata-rata ekspresi tertinggi ($0,98 \pm 0,47$), diikuti oleh kelompok kontrol negatif (K2) dengan nilai $0,92 \pm 0,21$ dan kelompok kontrol positif (K3)

sebesar $0,87 \pm 0,31$. Penurunan yang lebih jelas terlihat pada K4 dan K5, masing-masing dengan nilai $0,54 \pm 0,24$ dan $0,61 \pm 0,16$.

Uji normalitas *Shapiro Wilk* menunjukkan bahwa sebagian besar kelompok memiliki distribusi data yang mendekati normal ($p > 0,05$), kecuali pada K2 ($p = 0,001$) dan K4 ($p = 0,047$) yang menunjukkan distribusi tidak normal. Sehingga analisis dilanjutkan menggunakan uji non parametrik yaitu *Kruskal Wallis* yang menghasilkan nilai $p = 0,006$ menandakan terdapat perbedaan bermakna (signifikan) terhadap ekspresi TYR antar kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan analisa menggunakan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar pasangan kelompok.

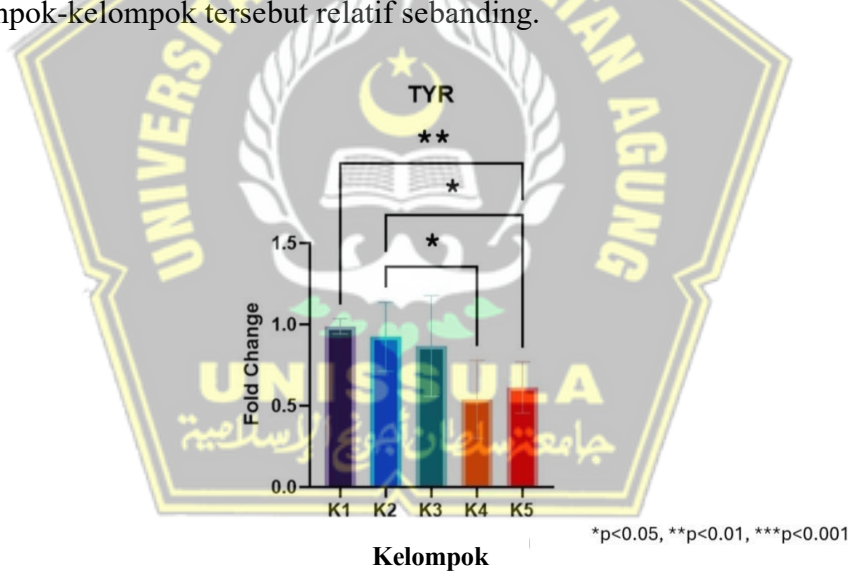
Tabel 5.4 Hasil Uji *Mann Whitney* gen TYR

Kelompok	Kelompok Perbandingan	<i>p(value)</i>
K1	K2	0,063
	K3	0,423
	K4	0,016
	K5	0,004
K2	K3	0,629
	K4	0,036
	K5	0,007
K3	K4	0,025
	K5	0,297
K4	K5	0,200

Keterangan : ada perbedaan bermakna jika $p < 0,05$

Hasil uji *Mann Whitney* yang disajikan pada Tabel 5.4 menunjukkan adanya perbedaan bermakna ekspresi gen TYR pada beberapa pasangan kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Kelompok sehat (K1) memiliki perbedaan signifikan dengan K4 ($p = 0,016$) dan K5 ($p = 0,004$), yang mengindikasikan bahwa perlakuan pada K4 dan K5 secara signifikan menurunkan ekspresi TYR.

Perbandingan K1 dengan K2 ($p = 0,063$) dan K1 dengan K3 ($p = 0,423$) tidak menunjukkan perbedaan bermakna. Kelompok kontrol negatif (K2) menunjukkan perbedaan signifikan dengan K4 ($p = 0,036$) dan K5 ($p = 0,007$), yang menandakan bahwa perlakuan pada K4 dan K5 memiliki efek penurunan ekspresi TYR yang lebih besar dibandingkan paparan UVB dengan pemberian NaCl. Perbedaan signifikan juga ditemukan antara K3 dan K4 ($p = 0,025$), yang menunjukkan bahwa perlakuan pada K4 lebih efektif dalam menekan ekspresi TYR dibandingkan perlakuan pada K3. Sebaliknya, tidak ditemukan perbedaan signifikan antara K2 dan K3 ($p = 0,629$), K3 dan K5 ($p = 0,297$), maupun K4 dan K5 ($p = 0,200$), yang mengindikasikan bahwa ekspresi TYR pada kelompok-kelompok tersebut relatif sebanding.



Gambar 5.7 Grafik Ekspresi Relatif Gen TYR

Berdasarkan grafik pada gambar 5.7 menunjukkan kelompok sehat (K1) memiliki nilai *fold change* mendekati 1,0 yang merepresentasikan kondisi basal ekspresi TYR pada kulit normal tanpa paparan UVB. Dari grafik tersebut menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok K1 dengan K5 dengan nilai rata-rata *fold change* adalah 0,98 dan 0,61. Terdapat perbedaan

signifikan antara kelompok K2 dengan K4 dan K5 dengan nilai rata-rata *fold change* secara berurutan adalah 0,92 ; 0,54 ; 0,61.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efek pemberian EH-MSCs tunggal dan kombinasinya dengan alpha arbutin dan niacinamide terhadap ekspresi gen p53 dan TYR pada mencit C57BL/6 yang diinduksi hiperpigmentasi oleh paparan UVB. Gen p53 merupakan protein penanda kerusakan DNA dan stres oksidatif, sedangkan TYR adalah enzim kunci dalam jalur melanogenesis. Penurunan ekspresi kedua gen ini diharapkan menjadi indikator keberhasilan intervensi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan sinar UVB pada mencit galur C57BL/6 berhasil menginduksi terjadinya hiperpigmentasi, yang divalidasi secara makroskopis terlihat dari kulit punggung mencit yang terpapar sinar UVB berwarna lebih gelap dibandingkan mencit yang tidak terpapar UVB. Secara mikroskopis dengan perwarnaan Masson Fontana terlihat distribusi melanin pada seluruh lapisan epidermis dengan jumlah yang lebih banyak dari pada kulit yang tidak terpapar UVB.

Kelompok sehat (K1) merefleksikan kondisi kulit sehat tanpa stres oksidatif. Secara molekuler, ekspresi p53 dan TYR berada pada level dasar, mencerminkan tidak adanya stres oksidatif maupun aktivasi jalur melanogenesis. Secara teori gen p53 memiliki dua peran yang saling bertolak belakang, tergantung pada kondisi aktivasi di dalam sel. Saat sel mengalami stres, seperti kerusakan DNA akibat paparan sinar UVB, p53 akan teraktivasi

secara fungsional. Aktivasi ini merangsang jalur pigmentasi melalui peningkatan produksi α -MSH dan ekspresi gen TYR, sehingga menyebabkan peningkatan produksi melanin dan munculnya hiperpigmentasi sebagai mekanisme perlindungan.

Sebaliknya, jika p53 hanya mengalami peningkatan ekspresi (over ekspresi) tanpa aktivasi oleh stres, maka gen ini justru dapat menekan ekspresi TYR. Artinya, bukan hanya jumlah p53 yang penting, tetapi juga status aktivasi fungsionalnya, yang menentukan apakah p53 akan merangsang atau justru menekan produksi melanin.²³

Dalam penelitian ini, dilakukan analisis terhadap efek EH-MSCs, baik secara tunggal maupun kombinasi dengan alpha arbutin 5% dan niacinamide 4%, terhadap ekspresi gen TYR dan p53 pada mencit C57BL/6 yang diinduksi sinar UVB untuk menimbulkan hiperpigmentasi.

Kelompok kontrol negatif (K2) adalah mencit yang diberi paparan UVB tanpa perlakuan terdapat perbedaan signifikan pada nilai ekspresi p53 dan TYR dibandingkan dengan K4 dan K5. Ekspresi p53 dan TYR pada K2 nilainya lebih tinggi dibandingkan K4 dan K5. Hal ini terjadi karena adanya proses kerusakan DNA dan aktivasi jalur melanogenesis akibat paparan sinar UVB.

Kelompok kontrol positif (K3) yaitu mencit yang diberi paparan UVB dan topikal α -arbutin 5% + niacinamide 4% terdapat perbedaan signifikan pada nilai ekspresi p53 dibandingkan dengan K4. Ekspresi p53 nilainya lebih tinggi dibandingkan K4. Hal ini disebabkan karena α -arbutin dan niacinamide menurunkan proses melanogenesis pada level enzimatik dan transfer melanosom, tetapi kurang berperan dalam memperbaiki kerusakan DNA akibat

paparan sinar UVB.

Dari hasil ekspresi gen pada kelompok perlakuan K4 dan K5 terjadi penurunan ekspresi p53 dan TYR. Kelompok K4 menunjukkan penurunan paling signifikan pada ekspresi p53 dan TYR. Penurunan ini sejalan dengan teori yang menyebutkan bahwa kemampuan *exosome* dalam memperbaiki kerusakan DNA dan menekan jalur aktivasi p53 akibat paparan UVB, serta kandungan *microRNA* dalam *exosome* yang menghambat melanogenesis.

Exosome dari MSCs, terutama yang dikondisikan pada hipoksia, diketahui membawa miR-145, miR-330-5p dalam jumlah lebih tinggi.³⁷ Molekul-molekul ini dapat masuk ke melanosit atau keratinosit, menekan ekspresi MITF/TYR, menghambat transfer melanosom, serta memperbaiki kerusakan DNA melalui penekanan p53 yang berlebihan akibat stres UVB.³⁸

Mekanisme ini melibatkan penghambatan jalur cAMP/PKA dan pengurangan ROS melalui kandungan enzim antioksidan seperti *Super Oxide Dismutase* (SOD) dan *Glutathione Peroxidase* (GPx) yang dibawa oleh *exosome*. Dengan membawa enzim tersebut yang bekerja menghambat stres oksidatif akibat paparan sinar UV, mengurangi oksidasi tirosin, dan menekan produksi melanin berlebih.²⁷

Secara biologis, hal ini mengindikasikan bahwa efek utama penurunan p53 kemungkinan besar sudah dicapai oleh pemberian *exosome* saja. *Exosome* memiliki kandungan bioaktif seperti miRNA, *growth factor*, protein, dan lipid yang dapat mengatur *cellular stress response* serta memperbaiki kerusakan DNA akibat paparan UVB. Perbaikan DNA yang lebih cepat akan mengurangi kebutuhan sel untuk mempertahankan ekspresi p53 pada level tinggi, sehingga

level p53 pada kelompok K4 sudah berada di titik “optimal” untuk proteksi sel.

Penambahan topikal alpha arbutin dan niacinamide pada K5 kemungkinan memberikan efek tambahan yang lebih fokus pada inhibisi melanogenesis dan peningkatan fungsi sawar kulit, bukan pada modulasi jalur *DNA damage response* yang dikendalikan oleh p53. Akibatnya, meskipun K5 secara klinis atau histologis mungkin menunjukkan penurunan hiperpigmentasi lebih nyata, perbedaan pada level p53 tidak terlalu menonjol dibandingkan K4. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa injeksi *exosome* sudah cukup efektif dalam menurunkan ekspresi p53 akibat paparan UVB, dan penambahan topikal alpha arbutin dan niacinamide tidak memberikan efek tambahan yang bermakna pada parameter ini.

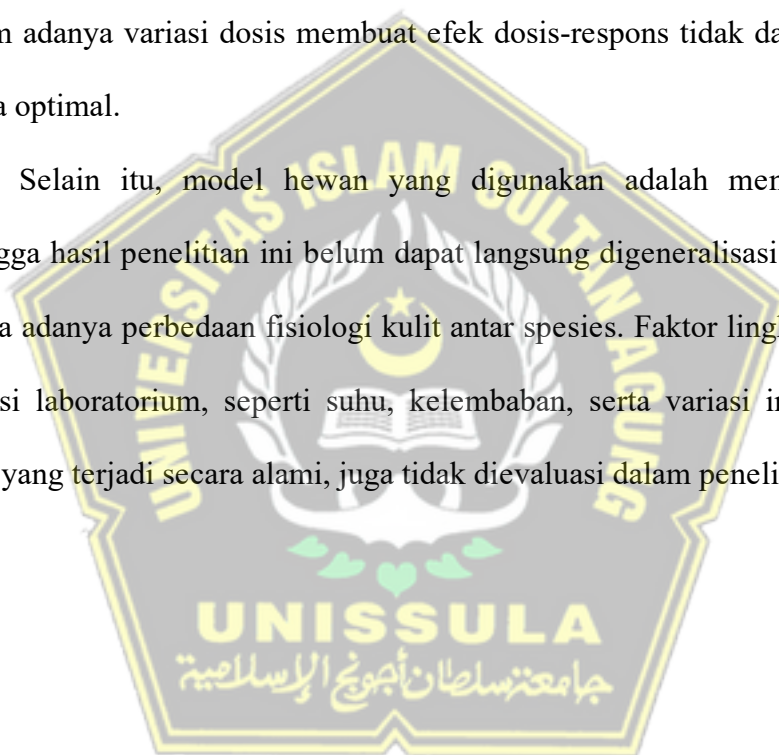
Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan dalam menginterpretasikan hasil. Pertama, durasi perlakuan hanya dilakukan selama 7 hari, sehingga efek jangka panjang dari pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs), baik tunggal maupun kombinasi dengan alpha arbutin dan niacinamide, terhadap ekspresi gen maupun perubahan morfologi kulit belum dapat diketahui secara menyeluruh. Kedua, jumlah sampel yang digunakan relatif terbatas, yaitu 30 ekor mencit yang dibagi dalam lima kelompok. Kondisi ini memungkinkan adanya variasi biologis antar individu yang dapat memengaruhi hasil penelitian.

Ketiga, penelitian ini tidak mengidentifikasi maupun mengukur secara kuantitatif berapa jenis dan kadar *microRNA* spesifik yang berperan dalam menurunkan hiperpigmentasi setelah perlakuan EH-MSCs. Keterbatasan ini membuat mekanisme molekuler yang mendasari penurunan ekspresi p53 dan

TYR belum sepenuhnya dapat dijelaskan.

Keempat, analisis yang dilakukan dalam penelitian ini masih terbatas pada level genetik, yaitu ekspresi gen p53 dan TYR menggunakan metode PCR. Validasi pada tingkat protein, misalnya melalui metode Western Blot atau *imunohistokimia* (IHC), belum dilakukan sehingga interpretasi hasil ekspresi gen terhadap fenotipe seluler masih terbatas. Keempat, penelitian ini hanya menggunakan satu dosis EH-MSCs (200 μ l) dan satu kombinasi bahan aktif. Belum adanya variasi dosis membuat efek dosis-respons tidak dapat dievaluasi secara optimal.

Selain itu, model hewan yang digunakan adalah mencit C57BL/6, sehingga hasil penelitian ini belum dapat langsung digeneralisasi pada manusia karena adanya perbedaan fisiologi kulit antar spesies. Faktor lingkungan di luar kondisi laboratorium, seperti suhu, kelembaban, serta variasi intensitas sinar UVB yang terjadi secara alami, juga tidak dievaluasi dalam penelitian ini.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200 µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi gen p53 dan *Tyrosinase* (TYR) pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi menunjukkan hal-hal berikut :

- a. Terdapat pengaruh pemberian injeksi kombinasi EH-MSCs 200 µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap penurunan ekspresi gen p53 dan TYR pada mencit C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB.
- b. Pemberian injeksi EH-MSCs dosis 200 µl tunggal (K4) menunjukkan hasil yang lebih signifikan dalam menurunkan ekspresi gen p53 dan TYR dibandingkan dengan kombinasi bersama alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% (K5).

6.2. Saran

- a. Penelitian selanjutnya disarankan untuk dilakukan dengan durasi perlakuan yang lebih panjang sehingga dapat mengevaluasi efek jangka panjang pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) terhadap ekspresi gen, morfologi kulit, maupun perubahan histopatologis.
- b. Jumlah sampel sebaiknya ditingkatkan agar variasi biologis antar individu dapat terakomodasi lebih baik dan hasil penelitian menjadi lebih

representatif.

- c. Penelitian lanjutan juga perlu difokuskan pada identifikasi dan kuantifikasi jenis *microRNA* yang terkandung dalam EH-MSCs serta perannya dalam menekan ekspresi p53 dan TYR. Metode seperti *microRNA profiling* atau *next-generation sequencing* dapat digunakan untuk mengungkap mekanisme molekuler yang lebih komprehensif.
- d. Validasi hasil sebaiknya dilanjutkan pada level protein menggunakan metode yang lebih sensitif, seperti *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), Western Blot, atau *immunohistochemistry* (IHC), guna memperkuat kuantifikasi protein dan enzim melanogenesis.
- e. Uji lanjutan pada manusia atau model praklinis lain diperlukan untuk mengevaluasi bioavailabilitas, durasi efek, serta interaksi exosome dengan bahan aktif pendukung. Evaluasi terhadap faktor lingkungan seperti suhu, kelembaban, dan variasi intensitas paparan UVB juga sebaiknya diperhatikan agar penelitian mendekati kondisi nyata di lapangan. Dengan demikian, potensi EH-MSCs sebagai agen terapeutik terhadap hiperpigmentasi dapat dipahami secara lebih menyeluruh.

DAFTAR PUSTAKA

1. Du Y, Doraiswamy C, Mao J, et al. Facial skin characteristics and concerns in Indonesia: A cross-sectional observational study. *Skin Research and Technology*. 2022;28(5):719-728. doi:10.1111/srt.13189
2. Goh CL, Kang HY, Morita A, et al. Awareness of sun exposure risks and photoprotection for preventing pigmentary disorders in Asian populations: Survey results from three Asian countries and expert panel recommendations. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2024;40(1). doi:10.1111/phpp.12932
3. Resviesw M, Goswami P, Sharma HK. Skin hyperpigmentation disorders and Use of herbal extracts: a review. *Current Trends in Pharmaceutical Research*. 2020;7(2). www.dibru.ac.in/ctpr
4. Wang F, Ma W, Fan D, Hu J, An X, Wang Z. The biochemistry of melanogenesis: an insight into the function and mechanism of melanogenesis-related proteins. *Front Mol Biosci*. 2024;11. doi:10.3389/fmolb.2024.1440187
5. Fabian IM, Sinnathamby ES, Flanagan CJ, et al. Topical Hydroquinones for Hyperpigmentation: A Narrative Review. *Cureus*. Published online November 15, 2023. doi:10.7759/cureus.48840
6. Dessai SRMF, Alexis AMF. *Skin of color*; 2014. Accessed April 16, 2025. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4142815/>
7. Chandorkar n, madankar cs, amin p, tambe S. Alpha Arbutin as a Skin Lightening Agent: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;13(02). doi:10.31838/ijpr/2021.13.02.446
8. Hakozaki t, hillebrand gg, greatesns A, et al. The Effect of Niacinamide on Reducing Cutaneous Pigmentation and Suppression of Melanosomes Transfer; 2002. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2002.04834.x
9. Zhang B, Gong J, He L, et al. Exosome based advancements for application in medical aesthetics. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10. doi:10.3389/fbioe.2022.1083640
10. Yoon JH, Jo CS, Hwang JS. Comprehensive Analysis of Exosomal MicroRNAs Derived from UVB-Irradiated Keratinocytes as Potential Melanogenesis Regulators. *Int J Mol Sci*. 2024;25(6). doi:10.3390/ijms25063095
11. Wang Y, He Z, Luo B, Wong H, Wu L, Zhou H. Human Mesenchymal Stem

- Cell-Described Exosomes Promote the Proliferation and Melanogenesis of Primary Melanocytes by Attenuating the H₂O₂-Related Cytotoxicity in vitro. *Clin Cosmet Invest Dermatol*. 2024;17:683-695. doi:10.2147/CCID.S446676
12. Vo N, Vu DM, Tran NHB, et al. Synergistic Anti-Aging Effects of Adipose-Described Stem Cell Extracellular Vesicles Loaded With Natural Compounds. *J Cosmet Dermatol*. 2025;24(2). doi:10.1111/jocd.70021
 13. Khobragade A, Shen-de SM. Herbal approaches to skin lightening: a comprehensive review. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.16(1).62-68
 14. Baumann LM. *Cosmetic Dermatology principles and practices second edition*. second. Mc Graw Hill Medical; 2009.
 15. Douki T. Oxidative Stress and Genotoxicity in Melanoma Induction: Impact on Repair Rather Than Formation of DNA Damages? *Photochem Photobiol*. 2020;96(5):962-972. doi:10.1111/php.13278
 16. Thawabtesh AM, Jibreesh A, Karaman D, Thawabtesh A, Karaman R. Skin Pigmentation Types, Causes and Treatment—A Review. *Molecules*. 2023;28(12). doi:10.3390/molecules28124839
 17. Moreiras H, Seabra MC, Barral DC. Melanin transfer in the epidermis: The pursuit of skin pigmentation control mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9). doi:10.3390/ijms22094466
 18. Bento-Lopes L, Cabaço LC, Charnesca J, Neto M V., Seabra MC, Barral DC. Melanin's Journey from Melanocytes to Keratinocytes: Uncovering the Molecular Mechanisms of Melanin Transfer and Processing. *Int J Mol Sci*. 2023;24(14). doi:10.3390/ijms241411289
 19. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2019;32(2):224-236. doi:10.1111/pcmr.12726
 20. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(10):924-931. doi:10.2340/00015555-3002
 21. Lai X, Wickers HJ, Solez-Lopez M, Dijkstra BW. Structures and Function of Human Tyrosinases and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry - A European Journal*. 2018;24(1):47-55. doi:10.1002/chem.201704410
 22. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1). doi:10.1038/s41392-023-01347-1
 23. Mary K. Khlgatian, Mark S, Mina Yaar, w PA, n IMH. Tyrosinase Gene Expression is Regulated by p53. doi:https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01667.x

24. Villarreal-Gómez LJ, Origel-Lucio S, Hernández-Hernández DA, Pérez-González GL. Use of Exosomes for Cosmetics Applications. *Cosmetics*. 2025;12(1). doi:10.3390/cosmetics12010009
25. Li D, Li D, Wang Z, et al. Signaling pathways activated and regulated by stem cell-derived exosome therapy. *Cell Biosci*. 2024;14(1). doi:10.1186/s13578-024-01277-7
26. Han G, Kim H, Kim DE, et al. The Potential of Bovine Colostrum-Derived Exosomes to Repair Aged and Damaged Skin Cells. *Pharmaceutics*. 2022;14(2). doi:10.3390/pharmaceutics14020307
27. Wang Y, He Z, Luo B, Wong H, Wu L, Zhou H. Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote the Proliferation and Melanogenesis of Primary Melanocytes by Attenuating the H₂O₂-Related Cytotoxicity in vitro. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2024;17:683-695. doi:10.2147/CCID.S446676
28. González-Cubero E, González-Fernández ML, Gutiérrez-Velasco L, Navarro-Ramírez E, Villar-Suárez V. Isolation and characterization of exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*. 2021;238(5):1203-1217. doi:10.1111/joa.13365
29. Atsubara† a m. The Effect of Niacinamides on Reducing Cutaneous Pigmentation and Suppression of Melanosomes Transfer.
30. Pan Y, Wu W, Jiang X, Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes in cardiovascular and cerebrovascular diseases: From mechanisms to therapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2023;163. doi:10.1016/j.biopha.2023.114817
31. Couteau C, Coiffard L. Overview of skin whitening agents: Drugs and cosmetic products. *Cosmetics*. 2016;3(3). doi:10.3390/cosmetics3030027
32. Garcia-Jimenez A, Tesruel-Puchet JA, Berna J, Rodriguez-Lopez JN, Tudeña J, Garcia-Canovas F. Action of tyrosinase on alpha and beta-arbutin: A kinetic study. *PLoS One*. 2017;12(5). doi:10.1371/journal.pone.0177330
33. Boo YC. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimeselanogenic and antioxidant properties. *Antioxidants*. 2021;10(7). doi:10.3390/antiox10071129
34. Saesedi M, Khezri K, Seyedi Zakaryaei A, Mohammadamini H. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin. *Phytotherapy Research*. 2021;35(8):4136-4154. doi:10.1002/ptr.7076
35. Furmanczyk M, Brown A, Bustos J, et al. Efficacy and tolerability of a depigmenting gel serum comprising tranexamic acid, niacinamide, 4-

- butylresorcinol, phytic acid, and a mixture of hydroxy acids that targets the biological processes regulating skin melanogenesis. *J Cosmet Dermatol*. 2024;23(6):2058-2065. doi:10.1111/jocd.16148
36. Nikfarjam S, Rezaei J, Zolbanin NM, Jafari R. Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine. *J Transl Med*. 2020;18(1). doi:10.1186/s12967-020-02622-3
 37. Dynoodt P, Messtdagh P, Van Peser G, et al. Identification of miR-145 as a key regulator of the pigmentedary processes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(1):201-209. doi:10.1038/jid.2012.266
 38. Hushcha Y, Blo I, Oton-Gonzalez L, et al. Micronas in the regulation of melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11). doi:10.3390/ijms22116104

