

**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (EH-MSCs), ALPHA
ARBUTIN DAN NIACINAMIDE TERHADAP
EKSPRESI *MELANOCORTIN 1 RECEPTOR* (MC1R)
DAN *TYROSINASE RELATED PROTEIN 1* (TYRP1)**

**(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

Indah Dwi Rahmah

MBK 2423010450

**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 *MELANOCORTIN 1 RECEPTOR* (MC1R) DAN *TYROSINASE RELATED PROTEIN 1* (TYRP1)
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi yang Diinduksi Sinar UVB)**

Disusun oleh
Indah Dwi Rahmah
MBK 2423010450

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

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II


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


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

Mengetahui,
Ketua program studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



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

PERNYATAAN

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

Semarang, 25 Agustus 2025


METTE
TEMPER
0005A1X413769668

(Indah Dwi Rahmah)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Indah Dwi Rahmah

Tempat / tanggal lahir : Way Jepara/ 17 September
1990

Agama : Islam

Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Simpang Pematang : Lulus tahun 1996
2. SDN 1 Simpang Pematang : Lulus tahun 2002
3. SMPN 1 Simpang Pematang : Lulus tahun 2005
4. SMA Al- Kautsar Bandar Lampung : Lulus tahun 2008
5. S1 Fakultas Kedokteran Yarsi : Lulus tahun 2012
6. Profesi Dokter : Lulus tahun 2014
7. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : 2024 - Sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Suami : dr. Erlangga Perwira Negara
2. Nama Anak : Adzkiya Qalesya Zahsy
Qarizh Afkari Nadhif

KATA PENGANTAR

Puji syukur terpanjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga proposal tesis dengan judul **“Pengaruh Kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) Alpha Arbutin dan Niacinamide Terhadap Ekspresi *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R) dan *Tyrosinase Related Protein 1* (TYRP1) (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB)”** ini dapat penulis selesaikan. Shalawat serta salam kami sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW, yang selalu menjadi pedoman kami.

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Pada penyusunan tesis ini penulis mendapat bantuan pengarahannya dan bimbingan, oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.HUM, Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, dan seluruh wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi SH. Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.

3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan sebagai dosen pembimbing kedua yang penuh perhatian, bimbingan, arahan, saran berharga, serta meluangkan waktu di tengah kesibukannya untuk mendampingi proses penyusunan tesis ini hingga dapat terselesaikan dengan baik.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan Sp.DVE Subsp. DKE, FINSADV, FAADV atas segala bentuk bimbingan, arahan, serta perhatian yang tulus, disertai kesabaran dan kebaikan dalam setiap kesempatan berdiskusi selama beliau menjadi dosen pembimbing pertama.
5. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes sebagai dosen penguji I yang telah memberikan evaluasi, kritik, dan saran yang menjadikan motivasi besar bagi saya untuk menghasilkan penelitian yang lebih baik.
6. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes sebagai dosen penguji II yang telah memberikan masukan dan kritik agar penelitian ini menjadi lebih baik dan bermanfaat.
7. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes sebagai dosen penguji III yang telah memberikan perhatian, nasehat dan saran dalam memperluas wawasan saya dan memperbaiki kualitas penelitian agar lebih terarah dan sistematis.
8. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
9. Segenap staf administrasi program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

10. Kedua orang tua, suami tercinta dr. Erlangga Perwira Negara, dan anak- anak saya, terima kasih untuk selalu ada, perhatian dan mendukung sampai saya bisa berjuang sejauh ini.

Dengan keterbatasan pengalaman, pengetahuan, dan pustaka yang digunakan, penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki banyak kekurangan serta memerlukan pengembangan lebih lanjut agar bermanfaat. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan tesis ini sekaligus menjadi bekal dalam penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa mendatang. Penulis juga memohon maaf atas segala kekhilafan, baik yang disengaja maupun tidak, selama proses studi dan penyusunan tesis. Semoga karya ini dapat memberi manfaat, khususnya bagi pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan serta Program Magister Ilmu Biomedis.

Semarang, 25 Agustus 2025

(Indah Dwi Rahmah)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
ABSTRAK	xv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1.Latar Belakang	1
1.2.Rumusan Masalah	6
1.3.Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4.Manfaat penelitian.....	8
1.4.1 Manfaat Teoritis	8
1.4.2 Manfaat Praktis	8
1.5. Originalitas Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1.Hiperpigmentasi	11
2.1.1 Etiologi Hiperpigmentasi	11
2.2.Melanin.....	14
2.3. <i>Melanocortin 1 Receptor (MC1R)</i>	18
2.3.1 Definisi.....	18
2.3.2 Reseptor melanokortin 1 (MC1R).....	19
2.3.3 Jalur Pensinyalan.....	19
2.4. <i>Tyrosinase Related Protein 1 (TYRP1)</i>	21

2.5. <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i> (EH-MSD).....	22
2.6 Alpha Arbutin	24
2.6.1 Mekanisme Kerja Alpha arbutin	25
2.7 Niacinamide	26
2.8 Efek kombinasi <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i> (EH-MSDs) Alpha Arbutin dan Niacinamide Terhadap Ekspresi <i>Melanocortin 1 Receptor</i> (<i>MC1R</i>) dan <i>TYRP1</i>	27
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	30
3.1 Kerangka Teori.....	30
3.2 Kerangka Konsep	33
3.3 Hipotesis.....	33
BAB IV METODE PENELITIAN	34
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	34
4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	35
4.2.1 Variabel Penelitian	35
4.2.1.1 Variabel bebas	35
4.2.1.2. Variabel Terikat.....	35
4.2.2. Definisi Operasional	35
4.2.2.1 EH-MSDs	36
4.2.2.2 Ekspresi <i>Melanocortin 1 Receptor</i> (MC1R)	36
4.2.2.3 Ekspresi <i>Tyrosinase Related protein 1</i> (TYRP1).....	36
4.2.2.4 Alpha Arbutin dan Niacinamide	37
4.3 Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	37
4.3.1 Subjek Penelitian	37
4.3.2 Sampel Penelitian.....	37
4.3.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	37
4.3.3.1 Kriteria Inklusi	37
4.3.3.2 Kriteria Eksklusi	38
4.3.3.3 Kriteria Drop Out	38
4.3.4 Cara Pengambilan Sampel Penelitian	38
4.3.5 Besar Sampel	38
4.4 Alat dan Bahan.....	39
4.4.1. Alat.....	39
4.4.2. Bahan	39

4.5 Cara Penelitian	40
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	40
4.5.2. <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i> (EH-MSCs).....	40
4.5.3. Pemaparan Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Penelitian	40
4.5.4 Terminasi dan Pengambilan Jaringan	41
4.5.5 Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA.....	41
4.5.6 Prosedur Pembuatan Preparat dan Pembacaan Hiperpigmentasi.....	43
4.5.7 Prosedur Pembacaan Ekspresi dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	43
4.6 Tempat dan Waktu Peneltian	44
4.7 Analisa Data	44
4.8 Alur Penelitian	46
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
5.1 Hasil Penelitian	47
5.1.1 Hasil Validasi EH-MSCs (<i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>).....	47
5.1.2. Validasi Makroskopis dan Histologi Jaringan Kulit Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi.....	51
5.1.3. Hasil Pemeriksaan Ekspresi MC1R.....	54
5.1.4. Hasil Pemeriksaan Ekspresi TYRP1.....	57
5.2.Pembahasan Hasil Penelitian	60
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	66
6.1. Kesimpulan	66
6.2. Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA.....	68
LAMPIRAN.....	75

DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AS	: <i>Age Spots</i>
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>
DHI	: <i>Dihydroxyindole</i>
DHICA	: <i>Dihydroxyindole Carboxylic Acid</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EH-MSCs	: <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
GPCRs	: <i>G protein-coupled receptors (GPCRs)</i>
GPX	: <i>Glutathione peroxidase</i>
GST	: <i>Glutathione S-Transferase</i>
hAMSCs	: <i>Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells</i>
HIF	: <i>Hypoxic Induce Factor</i>
HNF-1 α	: <i>Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha</i>
HPLC	: <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRT	: <i>Hormone Replacement Therapy</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
miRNA	: <i>MicroRNA</i>
MITF	: <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i>
MLPH	: <i>Melanophilin</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NAD	: <i>Nukleotida Piridina Nikotinamida-Adenin Dinukleotida</i>

NADP	: <i>Nikotinamida-Adenin Dinukleotida Fosfat</i>
NAFL	: <i>Non-ablative fractional laser</i>
PAR	: <i>Protease-Activated Receptor</i>
PAX3	: <i>Paired Box Gene 3</i>
PBASM	: <i>Pulsed Broadband Acoustic Shockwave</i>
PIH	: <i>Post-Inflammatory Hyperpigmentatio</i>
PKA	: <i>Protein kinase A</i>
POMC	: <i>Pro-opiomelanocortin</i>
Protein OA1	: <i>Ocular Abinism type 1 protein (juga dikenal sebagai GPR143)</i>
qRT-PCR	: <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOX10	: <i>SRY (sex-determining region Y)-BOX 10</i>
TBARS	: <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
TM	: <i>Transmembran</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TYR	: <i>Tyrosinase</i>
TYRP1	: <i>Tyrosinase-Related Protein 1</i>
TYRP2	: <i>Tyrosinase-Related Protein 2</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
UVA	: <i>Ultraviolet A</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
UVC	: <i>Ultraviolet C</i>
α -MSH	: <i>α-Melanocyte-stimulating Hormon</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	9
Tabel 5.1 Ekspresi MC1R.....	55
Tabel 5.2 Hasil Uji <i>Post Hoc Tamhane</i> MC1R.....	56
Tabel 5.3 Ekspresi TYRP1.....	58
Tabel 5.4 Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> TYRP1.....	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Mekanisme fisiologis pigmentasi kulit.....	14
Gambar 2.2 Jalur Biosintesis Melanin.....	16
Gambar 2.3 Protein yang berhubungan dengan melanogenesis dan transport melanosome.....	18
Gambar 2.4 Jalur pensinyalan MC1R dalam melanosit.....	20
Gambar 2.5. Jalur pigmentasi Ilustrasi jalur pigmentasi pada kulit manusia.....	22
Gambar 2.6 Mekanisme α -arbutin untuk pencerah kulit.....	25
Gambar 3.1 Kerangka Teori.....	32
Gambar 3.2 Kerangka Konsep.....	33
Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian.....	34
Gambar 4.3 Alur Penelitian.....	46
Gambar 5.1 Morfologi MSC.....	48
Gambar 5.2. Analisis <i>Flow Cytometry</i> terhadap ekspresi CD45, CD3, CD90, dan CD 29	49
Gambar 5.3. Diferensiasi MSCs.....	50
Gambar 5.4. Hasil Analisis Kadar <i>Exosome</i> menggunakan marker CD6, CD81 dan CD9.....	51
Gambar 5.5. Gambaran Makroskopis Jaringan Kulit Sehat dan Jaringan Kulit Setelah dipapar UVB pada Mencit C57BL/6.....	52
Gambar 5.6 Gambaran Mikroskopis Jaringan Kulit Sehat dan Jaringan Kulit Setelah dipapar UVB pada Mencit C57BL/6.....	53
Gambar 5.7 Ekspresi Relatif Gen MC1R.....	57
Gambar 5.8 Ekspresi Relatif gen TYRP1.....	60

ABSTRAK

Latar Belakang: Hiperpigmentasi merupakan kondisi kulit akibat peningkatan produksi melanin sering disebabkan paparan UVB. *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) dan *Tyrosinase Related Protein 1* (TYRP1) yang berperan dalam jalur melanogenesis. Kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs), alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% dapat menekan pembentukan melanin. Tujuan : untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi EH-MSCs, alpha arbutin, dan niacinamid terhadap ekspresi MC1R dan TYRP1 pada mencit hiperpigmentasi.

Metode: Penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group* menggunakan rancangan acak lengkap dan enam ulangan tiap kelompok. Subjek mencit jantan C57BL/6 diinduksi hiperpigmentasi melalui paparan UVB. Hewan coba dibagi dalam lima kelompok, yaitu K1 (tanpa UVB), K2 (UVB + NaCl 0,9%), K3 (UVB + alpha arbutin 5% + niacinamide 4%), K4 (UVB + injeksi EH-MSCs 200 µl), dan K5 (UVB + kombinasi EH-MSCs 200µl, alpha arbutin 5%, niacinamide 4%). Evaluasi ekspresi gen MC1R dan TYRP1 dilakukan hari ke-7 menggunakan qRT-PCR. Analisis data memakai *one-way* ANOVA dilanjutkan uji *post-hoc* LSD dan *post-hoc* Tamhane.

Hasil: Ekspresi MC1R terendah pada K4 ($0,992 \pm 0,352$), TYRP1 terendah pada K5 ($0,732 \pm 0,380$), keduanya berbeda bermakna dengan K2 ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Pemberian kombinasi EH-MSCs, alpha arbutin dan niacinamid terbukti menurunkan ekspresi MC1R dan TYRP1 pada mencit dengan hiperpigmentasi.

Kata Kunci:

Exosome, Hypoxia Mesenchymal Stem Cells, MC1R, TYRP1, alpha arbutin, niacinamide

ABSTRACT

Background: Hyperpigmentation is a skin condition caused by increased melanin production, often triggered UVB exposure. Melanocortin-1 Receptor (MC1R) and Tyrosinase Related Protein 1 (TYRP1), which play roles in the melanogenesis pathway. Combination with Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs), 5% alpha arbutin, and 4% niacinamide has the potential to suppress melanin formation. Objective: To evaluate the effects of EH-MSCs, alpha arbutin, and niacinamide combination therapy on MC1R and TYRP1 expression in hyperpigmented mice.

Methods: An experimental study with a post-test only control group design was conducted using a completely randomized design with six replications per group. Male C57BL/6 mice were induced with hyperpigmentation through UVB exposure. The animals were divided into five groups: K1 (no UVB), K2 (UVB + 0.9% NaCl), K3 (UVB + 5% alpha arbutin + 4% niacinamide), K4 (UVB + 200 μ l EH-MSCs injection), and K5 (UVB + 200 μ l EH-MSCs + 5% alpha arbutin + 4% niacinamide). Gene expression of MC1R and TYRP1 was evaluated on day 7 using qRT-PCR. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by LSD and Tamhane post-hoc tests.

Results: The lowest MC1R expression was observed in K4 (0.992 ± 0.352), while the lowest TYRP1 expression was found in K5 (0.732 ± 0.380), both showing significant differences compared to K2 ($p < 0.05$).

Conclusion: The combination of EH-MSCs, alpha arbutin, and niacinamide effectively reduced MC1R and TYRP1 expression in hyperpigmented mice.

Keywords:

Exosome, Hypoxia Mesenchymal Stem Cells, MC1R, TYRP1, alpha arbutin, niacinamide

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pigmentasi kulit merupakan mekanisme kompleks yang melibatkan interaksi antara melanosit dan keratinosit, yang dikendalikan oleh berbagai jalur pensinyalan serta aktivitas hormon. Aktivasi *melanocortin 1 receptor* (MC1R) oleh *α -melanocyte stimulating hormone* (α -MSH) pada melanosit memicu jalur cAMP (*Cyclic AMP*) yang meningkatkan ekspresi *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF).¹ *Melanocortin 1 receptor* adalah reseptor di permukaan melanosit yang berperan penting dalam proses pembentukan melanin. Tingginya ekspresi MC1R dikaitkan dengan peningkatan sintesis eumelanin yaitu jenis pigmen gelap yang sering muncul pada kondisi hiperpigmentasi.^{2,3} *Tyrosinase Related Protein 1* (TYRP1) merupakan enzim yang berfungsi dalam proses biosintesis melanin. Enzim TYRP1 bekerja bersama dengan enzim lain seperti *tyrosinase* dan TYRP2 untuk mengatur produksi dan jenis melanin yang dihasilkan. Gangguan atau stimulasi berlebih pada jalur ini dapat menyebabkan akumulasi melanin dan munculnya hiperpigmentasi.⁴ *Melanocortin 1 receptor* secara langsung mengatur jalur pensinyalan cAMP-PKA-CREB yang memperkuat transkripsi gen-gen melanogenik seperti TYRP1. Menarget ekspresi MC1R dan TYRP1 menjadi strategi penting dalam penanganan hiperpigmentasi.

Hiperpigmentasi adalah kondisi kulit yang ditandai dengan munculnya area atau lesi yang lebih gelap dari sekitarnya akibat peningkatan aktivitas dalam produksi, distribusi, atau perpindahan melanin secara berlebihan pada jaringan epidermis.⁵ Indonesia beriklim tropis sehingga paparan sinar matahari tinggi sepanjang tahun yang menyebabkan penduduknya terekspos radiasi ultraviolet (UV) secara terus-menerus.⁶ Berdasarkan panjang gelombangnya, radiasi UV diklasifikasikan menjadi tiga kategori utama, yaitu UV-A (400–315 nanometer), UV-B (315–280 nanometer), dan UV-C (280–10 nanometer).⁷ Radiasi ultraviolet merupakan faktor lingkungan eksternal (*eksogen*) yang mampu menginduksi aktivasi proses melanogenesis yaitu sintesis pigmen melanin oleh sel melanosit. Di antara ketiga jenis tersebut, UVB diketahui memiliki potensi tertinggi dalam menstimulasi respons melanogenik kulit.⁸

Hiperpigmentasi merupakan salah satu masalah dermatologis yang paling sering dijumpai, baik secara global maupun di Indonesia. Berdasarkan survei global tahun 2023 terhadap 48.000 responden dari 34 negara (periode Desember 2022–Februari 2023), sekitar 50% responden dilaporkan mengalami setidaknya satu jenis kelainan pigmentasi kulit.⁵ Hiperpigmentasi termasuk melasma cukup umum terjadi di Indonesia. Gangguan hiperpigmentasi mencapai 33,6% dari 4.559 kunjungan pasien di poliklinik kulit dan kelamin pada tahun 2014, menurut data Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta. Sekitar 14,1 persen pasien rawat jalan di RSUD Dr. Soetomo Surabaya pada tahun 2019 didiagnosis dengan hiperpigmentasi, dengan total 1.313 pasien.⁹

Dampak psikososial akibat kondisi ini juga cukup besar, di mana 47,3% pasien mengaku kehilangan rasa percaya diri, 32,7% merasa tidak menarik secara fisik, dan 23,6% menyatakan terganggunya aktivitas sosial.¹⁰ Di Indonesia, mayoritas pasien hiperpigmentasi adalah perempuan berusia 25–55 tahun dengan paparan sinar matahari sebagai faktor pencetus utama. Dengan demikian, hiperpigmentasi tidak hanya menimbulkan perubahan fisik dan masalah estetika, tetapi juga berimplikasi terhadap kualitas hidup serta beban psikososial penderita.^{9,10}

Terapi hiperpigmentasi dapat secara topikal dan prosedur medis, baik tunggal maupun kombinasi tergantung pada penyebab dan tingkat keparahannya.¹¹ Terapi topikal menggunakan tabir surya dan agen depigmentasi seperti hidrokuinon, golongan retinoid, asam azelaik, asam kojik, dan lain-lain. Prosedur medis seperti chemical peeling, mikrodermabrasi, dan laser digunakan untuk mempercepat regenerasi kulit.¹² Terapi hiperpigmentasi yang hanya menargetkan enzim tirosinase seringkali kurang efektif dan dapat menimbulkan efek samping, seperti iritasi atau hiperpigmentasi rebound. Hidrokuinon merupakan terapi lini pertama dalam terapi hiperpigmentasi dengan konsentrasi penggunaan antara 2% hingga 5%. Penggunaannya dapat dilakukan secara tunggal atau dikombinasikan dengan agen farmasi lain seperti retinoid dan kortikosteroid guna meningkatkan efektivitas terapi. Hidrokuinon bekerja dengan cara menghambat enzim *tyrosinase* (TYR), merusak melanosom, serta memicu kematian sel melanosit melalui perubahan struktur membran sel. Kombinasi mekanisme tersebut mendasari kemampuan hidrokuinon sebagai

agen depigmentasi, namun sekaligus menjelaskan potensi efek toksiknya. Penggunaan hidrokuinon dalam jangka panjang memiliki risiko efek samping seperti okronosis dan cenderung terjadi kekambuhan setelah terapi dihentikan. Karena risiko karsinogenik yang signifikan bila digunakan dalam jangka panjang, penggunaan hidrokuinon dalam produk kosmetik telah dilarang sejak tahun 2001.¹²⁻¹⁴ Oleh karena itu, dikembangkan alternatif terapi menggunakan alpha arbutin yang dikombinasikan dengan niacinamide. Kombinasi alpha arbutin dan niacinamide dinilai lebih aman serta efektif dalam menurunkan pigmentasi, karena keduanya berperan dalam menghambat proses melanogenesis dengan jalur yang berbeda tanpa menimbulkan risiko efek samping yang tinggi seperti pada hidrokuinon.¹⁵

Alpha arbutin adalah turunan hidrokuinon yang secara kimiawi lebih stabil dan memiliki efek toksisitas yang lebih rendah. Alpha arbutin bekerja dengan cara menurunkan biosintesis melanin melalui jalur penghambatan aktivitas enzim tirosinase atau *inhibitor* kompetitif enzim *tyrosinase*, sehingga menghambat tahap awal melanogenesis, yaitu konversi tirosin menjadi L-DOPA. Keunggulan alpha arbutin terletak pada tolerabilitasnya yang lebih baik dibandingkan hidrokuinon, serta potensi depigmentasi yang signifikan tanpa menyebabkan iritasi kulit yang berat.^{16,17} Niacinamide merupakan bentuk aktif dari vitamin B3 yang memiliki efek multifungsi, termasuk sebagai agen antiinflamasi, antioksidan, dan penghambat transfer melanosom. Niacinamide menghentikan penyebaran pigmentasi pada kulit dengan menghalangi transfer melanin dari melanosit ke keratinosit. Selain itu, niacinamide juga diketahui

memiliki sifat anti-inflamasi dan antioksidan yang mendukung perbaikan *barrier* kulit dan mencegah pembentukan pigmentasi baru.^{18,19}

Pendekatan regeneratif berbasis sel punca mesenkimal (*mesenchymal stem cells*, MSCs), terutama yang dikultur dalam kondisi hipoksia (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*, EH-MSCs), menunjukkan potensi terapeutik baru dalam modulasi pigmentasi kulit. *Exosome* yang diisolasi dari MSCs mengandung berbagai molekul bioaktif, termasuk protein, lipid, dan microRNA (miRNA), yang berperan dalam regulasi transkrip genetik, termasuk ekspresi MITF, MC1R, dan TYRP1.²⁰ Penelitian eksperimental menunjukkan bahwa *exosome* MSCs, terutama dalam kondisi hipoksia, dapat menekan proses melanogenesis dan mempercepat regenerasi kulit yang mengalami stres oksidatif akibat UVB. Kondisi hipoksia pada MSCs terbukti meningkatkan sekresi *exosome* yang mengandung berbagai miRNA dan faktor pertumbuhan, yang berperan menghambat proses melanogenesis. Penelitian terdahulu yang telah dilakukan mengungkapkan bahwa *Exosome* yang berasal dari *human amniotic mesenchymal stem cells* (hAMSCs), mampu menekan proses melanogenesis serta meningkatkan degradasi melanosom melalui aktivasi jalur *autophagy*.²¹ Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa penggunaan *exosome* dengan dosis 200µl dapat efektif mengurangi hiperpigmentasi.²²

Penggunaan terapi tunggal dari masing-masing agen seringkali menghasilkan efek yang terbatas dan tidak bertahan lama. Oleh karena itu, pendekatan kombinasi menjadi strategi terapeutik yang menjanjikan. Kombinasi *exosome hypoxia mesenchymal stem cells* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin

5%, dan niacinamide 4% diharapkan mampu memberikan efek sinergis dalam menghambat pigmentasi melalui mekanisme banyak target dengan cara penghambatan tirosinase, pengurangan transfer melanosom, serta modulasi epigenetik terhadap ekspresi gen melanogenesis. Hingga saat ini, belum banyak penelitian yang mengevaluasi efek kombinasi dari *exosome hypoxia mesenchymal stem cells* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% pada model hiperpigmentasi yang diinduksi oleh UVB pada ekspresi MC1R dan TYRP1 secara in vivo. Oleh karena itu peneliti bermaksud melakukan penelitian untuk memastikan pengaruh pemberian EH-MSCs 200µl, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% terhadap ekspresi MC1R dan TYRP1 dalam model hiperpigmentasi yang diinduksi oleh sinar UVB pada tikus C57BL/6. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan terapi estetika medik yang lebih efektif, aman, dan berbasis biologis dalam menangani masalah hiperpigmentasi kulit.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R) dan *Tyrosinase Related Protein 1* (TYRP1) pada Mencit C57BL/6 model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH- MSCs), alpha arbutin dan niacinamide terhadap ekspresi *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R) dan *Tyrosinase Related Protein 1* (TYRP1) pada Mencit C57BL/6 model Hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB.

1.3.2 Tujuan khusus

- a. Penelitian ini bertujuan membuktikan pengaruh pemberian kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R) pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.
- b. Penelitian ini bertujuan membuktikan pengaruh pemberian kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi *Tyrosinase Related Protein 1* (TYRP1) pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi bukti ilmiah yang memperkuat pemahaman mengenai peran *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R) dan *tyrosinase related protein 1* (TYRP1) pada Mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan pemanfaatan pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R) dan *tyrosinase related protein 1* (TYRP1) sebagai agen depigmentasi bagi individu yang terpapar sinar UVB yang aman, efektif dan berbasis bukti.

1.5. Originalitas Penelitian

Berbagai penelitian terdahulu menunjukkan potensi terapeutik *exosome* dari sel punca mesenkimal dalam mengatasi gangguan kulit akibat hiperpigmentasi. *Exosome* dari MSC tali pusat manusia (hUCMSC-Exos) terbukti efektif dan aman mengurangi melasma melalui metode NAFL dan PBASM. *Exosome* dari sel punca adiposa hipoksia (ADSC) melindungi kulit

dari cedera UVB melalui circ-Ash11 yang menekan stres oksidatif dan inflamasi. MiR-340 menghambat melanogenesis dengan menurunkan MITF, TYRP1, dan TYR, sehingga berpotensi sebagai terapi hiperpigmentasi. EH- MSCs menekan Apaf-1 dan meningkatkan Survivin, memberikan efek protektif terhadap penuaan kulit akibat UVB. Kombinasi hADSC-Exos dengan antioksidan (melatonin, vitamin C) secara sinergis meningkatkan viabilitas fibroblas, menurunkan ROS, menekan MMP-1, serta memperbaiki dermis melalui peningkatan kolagen tipe I dan elastin. Secara keseluruhan, *exosome* baik tunggal maupun dikombinasikan dengan agen bioaktif, menjanjikan sebagai terapi aman dan efektif untuk melindungi serta memperbaiki kulit dari kerusakan UV dan hiperpigmentasi.

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Metode	Hasil
1.	Wang T, Gao H, Wang D, Zhang C, Hu K, Zhang H, Lin J, Chen X. 2023. ²³	<i>Stem cell-derived exosomes in the treatment of melasma and its percutaneous penetration</i>	In vivo, eksperimental	Pemberian <i>exosome</i> yang berasal dari <i>human umbilical cord mesenchymal stem cells</i> (hUCMSC-Exos) dengan menggunakan metode <i>microneedles</i> , NAFL dan PBASM ketiganya aman dan efektif dalam mengurangi melasma serta dapat meningkatkan penetrasi transdermal

2.	Zha J, Pan Y, Liu X, Zhu H, Liu Y, Zeng W, 2022 ²⁴	<i>Exosomes from hypoxia-pretreated adipose-derived stem cells attenuate ultraviolet light-induced skin injury via delivery of circ-Ash11</i>	In vivo dan in vitro, eksperimental	<i>Exosome</i> yang berasal dari <i>adipose derived stemcells</i> (ADSCs) pada kondisi hipoksia memiliki potensi terapeutik yang lebih baik dibandingkan pada kondisi normoksia dalam memperbaiki kerusakan kulit akibat paparan sinar ultraviolet B (UVB).
3.	Yang Y, Wei X, Bai J, 2020. ²⁵	<i>MicroRNA-340 is involved in ultraviolet B induced pigmentation by regulating the MITF/TYRP1 axis</i>	In vitro, eksperimental	miR-340 sebagai regulator negatif melanogenesis akibat UVB, Overekspresi miR-340 dapat mengurangi ekspresi MITF dan TYRP1, sehingga menurunkan pembentukan melanin.
4.	Megawati Agustina C, Setiawan E, Putra A, 2025. ²⁶	<i>MSC-Exosomes Hypoxia (EH-MSCs) in modulating Apaf-1 and Survivin in UVB-induced skin aging</i>	In vivo, eksperimental	Pemberian MSCs-Exosome Hipoksia (EH-MSCs) dengan dosis 200µl dan 300µl mampu menekan ekspresi gen pro-apoptotik dan meningkatkan gen anti-apoptotik secara signifikan
5.	Fu Y, Xie J ling, Zhang W ting, 2024. ²⁷	<i>Synergistic delivery of hADSC-Exos and antioxidants has inhibitory effects on UVB-induced skin photoaging</i>	In vitro dan in vivo, eksperimental	kombinasi hADSC-Exos dan antioksidan dapat meningkatkan viabilitas fibroblas dermal, menurunkan ROS, serta menekan MMP-1 dan meningkatkan kolagen I dan elastin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi merupakan kondisi dermatologis yang ditandai dengan munculnya area kulit yang tampak lebih gelap dibandingkan dengan kulit sekitarnya yang normal akibat peningkatan aktivitas dalam sintesis, distribusi, atau perpindahan melanin secara berlebihan pada jaringan epidermis.^{5,28} Melanin diproduksi oleh sel melanosit di dalam organel yang disebut melanosom. Melalui proses melanogenesis enzim-enzim pembentuk melanin seperti tirosinase dan protein terkait lainnya bekerja dengan bantuan protein kompleks tertentu agar bisa mencapai lokasi kerjanya. Setelah melanin diproduksi, melanosom yang telah terisi melanin kemudian ditransfer ke sel-sel kulit (keratinosit).^{28,29}

2.1.1 Etiologi Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi terjadi akibat peningkatan sintesis melanin, yaitu pigmen utama yang menentukan warna kulit, dan diproduksi oleh sel melanosit.⁵ Hiperpigmentasi dapat dipicu oleh berbagai faktor internal maupun eksternal yang memengaruhi aktivitas sel melanosit.²⁹ Salah satu faktor utama penyebab hiperpigmentasi adalah paparan sinar UV terutama UVB, sehingga memicu aktivasi enzim tirosinase dan menstimulasi melanogenesis sebagai mekanisme pertahanan kulit terhadap kerusakan DNA. Paparan sinar UV sejak

usia dini telah terbukti memperparah munculnya hiperpigmentasi seperti melasma, noda pasca-inflamasi, dan *age spots*.³⁰

Pengaruh hormonal dapat menyebabkan hiperpigmentasi pada wanita usia subur, seperti peningkatan estrogen dan progesteron yang terjadi selama kehamilan, kontrasepsi oral, dan terapi penggantian hormon (HRT).⁷ Estrogen dalam kontrasepsi oral kombinasi, diketahui dapat merangsang aktivitas enzim tirosinase serta meningkatkan ekspresi protein-protein seperti TYRP1, TYRP2, MITF, dan reseptor MC1R yang berperan penting dalam melanogenesis.³¹

Penurunan jumlah melanosit pada kulit sejalan dengan bertambahnya usia. Sel-sel melanosit yang masih ada mengalami peningkatan ukuran dan aktivitas, sehingga memicu perubahan fisiologis yang signifikan. Pada individu berusia di atas 40 tahun. Kondisi ini sering kali ditandai dengan munculnya bintik-bintik penuaan atau lentigo senilis, yang merupakan manifestasi dari peningkatan produksi melanin secara lokal pada area kulit yang terpapar sinar matahari secara kronis.²⁸

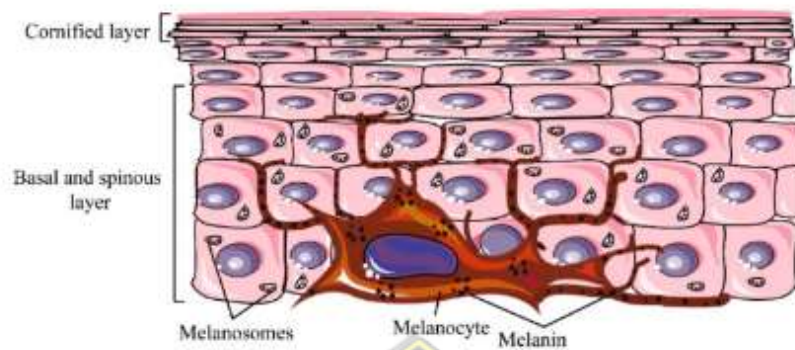
Faktor genetik merupakan salah satu determinan utama dalam regulasi pigmentasi kulit. Gen-gen tertentu memengaruhi jumlah melanosit, aktivitas dan sintesis melanin, serta respons melanosit terhadap rangsangan seperti sinar UV, hormon, dan inflamasi, sehingga genetik tertentu lebih berisiko mengalami hiperpigmentasi.^{32,33} Secara genetik, produksi melanin baik eumelanin (pigmen gelap) maupun pheomelanin (pigmen terang) dikendalikan oleh lebih dari 100 gen yang bekerja dalam jalur-jalur molekuler kompleks.³⁴ Orang dengan kulit lebih gelap memiliki melanosom yang lebih besar, lebih

banyak, dan lebih tersebar merata, dibandingkan dengan yang berkulit terang. Hal ini menjelaskan mengapa kelompok etnis tertentu lebih rentan terhadap bentuk hiperpigmentasi.³⁵

Hiperpigmentasi yang sering ditemukan dalam praktik klinis dapat berupa *Post-inflammatory Hyperpigmentation (PIH)*.⁸ *Post-Inflammatory Hyperpigmentation* merupakan kondisi yang terjadi akibat aktivasi melanogenesis pasca inflamasi atau cedera kulit. Berbagai faktor penyebab inflamasi seperti luka bakar, paparan bahan kimia iritatif, psoriasis, dermatitis atopik, maupun jerawat dapat merangsang produksi melanin yang berlebihan dan mendistribusikannya secara tidak merata di lapisan epidermis atau dermis.^{28,36}

Penggunaan antibiotik seperti minosiklin, kontrasepsi oral, antimalaria, dan antidepresan trisiklik, telah dilaporkan menyebabkan efek samping hiperpigmentasi.³⁷ Kondisi medis sistemik seperti penyakit Addison dapat menyebabkan hiperpigmentasi difus akibat stimulasi melanogenesis yang disebabkan oleh gangguan fungsi adrenal. Tindakan medis atau estetika, seperti penggunaan laser atau terapi cahaya tanpa perlindungan UV yang memadai, juga dilaporkan sebagai pencetus hiperpigmentasi baik bersifat sementara maupun permanen.^{28,37}

2.2. Melanin



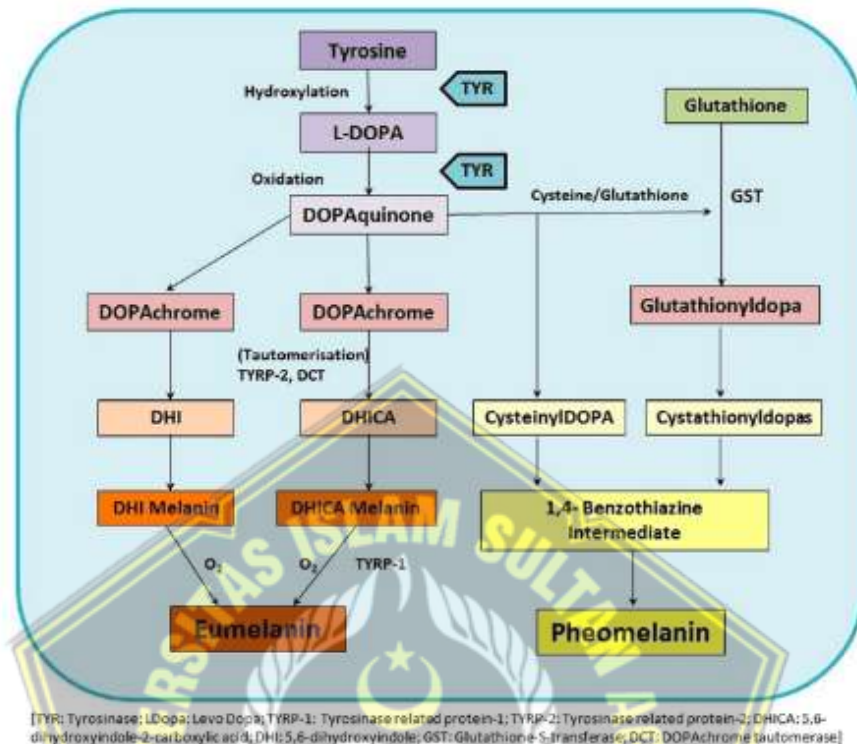
Gambar 2.1. Mekanisme fisiologis pigmentasi kulit.²

Melanosit merupakan sel pigmentasi berbentuk dendritik yang berasal dari kista neural dan tersebar di berbagai jaringan seperti kulit, folikel rambut, mata, dan telinga bagian dalam. Fungsi utama melanosit menghasilkan melanin, yaitu pigmen penting perlindungan terhadap sinar UV dan radikal bebas.³⁸ Melanin disintesis di dalam melanosom melalui jalur biokimia yang dimulai dari asam amino L-tirosin dan dikatalisis oleh enzim utama seperti *tyrosinase*, TYRP1, dan TYRP2. Proses ini bersifat kompleks dan dipengaruhi berbagai faktor genetik, hormonal, dan lingkungan.³ Melanosom adalah organel seperti lisosom yang berperan sebagai tempat biosintesis, penyimpanan, dan transfer melanin. Organel ini mengalami empat tahap maturasi, dari tahap I (pre-melanosom tanpa pigmen) hingga tahap IV (melanosom matur berisi melanin padat). Melanosom yang matur dipindahkan ke ujung dendritik melanosit dan ditransfer ke keratinosit melalui mekanisme fagositosis, memberi warna pada kulit dan melindungi sel terhadap radiasi UV.³⁹

Ada dua jenis melanin yang lebih gelap disebut *eumelanin*, dan yang lebih terang disebut *pheomelanin*. Rasio antara kedua tipe melanin tersebut menentukan karakteristik warna kulit dan rambut serta berpengaruh pada kemampuan perlindungan terhadap radiasi ultraviolet (UV). Eumelanin diketahui lebih efektif dalam menyerap radiasi UV dan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, sedangkan pheomelanin menghasilkan lebih banyak spesies oksigen reaktif (ROS), sehingga berkontribusi terhadap kerusakan DNA dan peningkatan risiko karsinogenesis kulit akibat paparan UV.^{2,40}

Proses melanogenesis dimulai dengan hidroksilasi tirosin menghasilkan L-DOPA, kemudian mengalami oksidasi menjadi dopaquinone. Kedua reaksi ini dipicu oleh enzim *tyrosinase* yang berperan sebagai enzim utama dalam proses melanogenesis.⁴¹ Pada jalur *eumelanin*, *dopaquinone* mengalami transformasi menjadi *dopachrome*, yang membentuk dua jenis intermediat DHI dan DHICA yang kemudian mengalami oksidasi dan polimerisasi membentuk *eumelanin* yaitu pigmen gelap yang bersifat fotoprotektif dan antioksidan. Proses ini dikatalisis oleh enzim TRP-2 dan TYRP1.⁴²

Jalur pembentukan *pheomelanin* ditandai dengan tingginya kadar sistein atau glutathion yang memicu adisi *dopaquinone* sehingga terbentuk *intermediat cysteinyl DOPA* dan *glutathionyldopa* dengan bantuan enzim *glutathione S transferase* (GST). Intermediat ini kemudian dikonversi menjadi *1,4 benzothiazinedan*, yang selanjutnya berpolimerisasi menjadi *pheomelanin*, pigmen merah kuning yang kurang stabil dan lebih rentan terhadap stres oksidatif serta pembentukan radikal bebas.⁴²

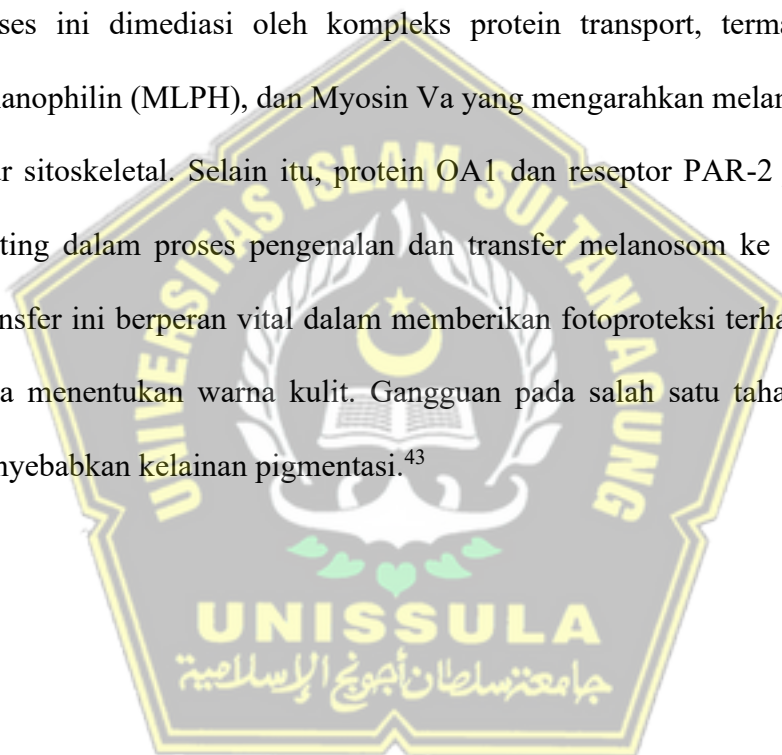


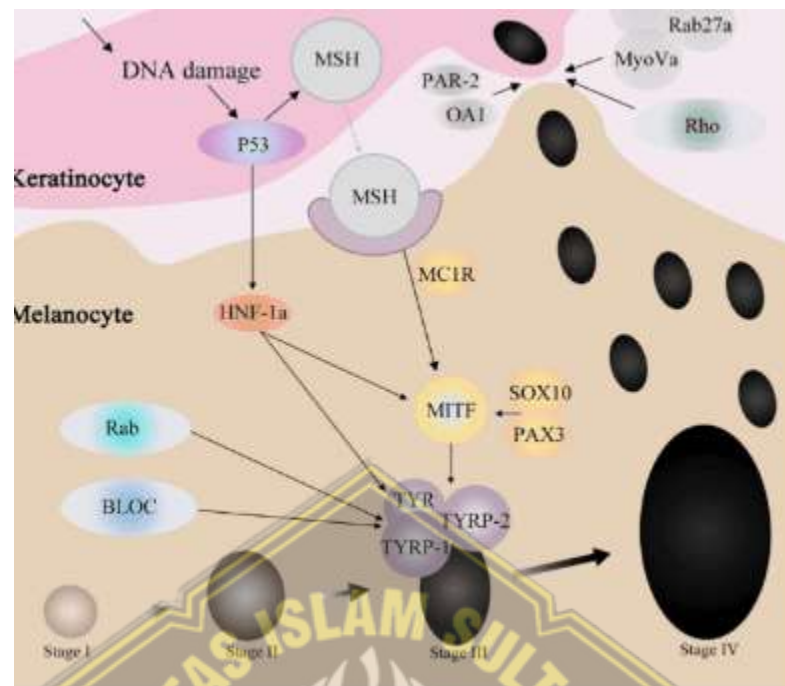
Gambar 2.2 Jalur biosintesis melanin.²

Paparan sinar ultraviolet khususnya UVB, merupakan salah satu faktor eksternal utama yang mengaktifasi jalur melanogenesis. Proses ini dimulai dari kerusakan DNA pada sel keratinosit akibat radiasi UV, yang memicu ekspresi protein p53. Gen p53 menginduksi produksi dan sekresi α -MSH oleh keratinosit. Hormon ini berikatan dengan reseptor MC1R pada permukaan sel melanosit, memicu aktivasi jalur sinyal cAMP–PKA. Sehingga terjadi peningkatan ekspresi MITF yang merupakan regulator utama biosintesis melanin di dalam melanosit.⁴³

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) mengatur

transkripsi gen-gen penting dalam proses pigmentasi, termasuk TYR, TYRP1, dan TYRP2/DCT. Selain MC1R, aktivitas MITF juga dikendalikan oleh faktor-faktor transkripsi lain seperti SOX10, PAX3, dan HNF-1 α . Ketiganya berperan penting dalam diferensiasi melanosit dan regulasi genetik selama stres oksidatif akibat UV.^{2,5,43} Setelah melanin disintesis, tahap selanjutnya adalah transportasi melanosom menuju ujung dendrit melanosit untuk ditransfer ke keratinosit.³⁹ Proses ini dimediasi oleh kompleks protein transport, termasuk Rab27a, melanophilin (MLPH), dan Myosin Va yang mengarahkan melanosom melalui jalur sitoskeletal. Selain itu, protein OAI dan reseptor PAR-2 juga berperan penting dalam proses pengenalan dan transfer melanosom ke keratinosit.^{3,43} Transfer ini berperan vital dalam memberikan fotoproteksi terhadap sinar UV serta menentukan warna kulit. Gangguan pada salah satu tahapan ini dapat menyebabkan kelainan pigmentasi.⁴³





Gambar 2.3 Protein yang berhubungan dengan melanogenesis dan transport melanosome.³

2.3. *Melanocortin 1 Receptor (MC1R)*

2.3.1 Definisi

Melanocortin 1 Receptor (MC1R) merupakan reseptor membran yang termasuk dalam keluarga G protein-coupled receptor (GPCR) dan memiliki peran penting dalam regulasi pigmentasi kulit. Aktivasi MC1R terjadi melalui ikatan dengan *α-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH) yang berasal dari pemrosesan *proopiomelanocortin* (POMC), serta dapat juga dipicu oleh *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH). Proses aktivasi ini menstimulasi jalur cAMP–protein kinase A (PKA) yang akan menginduksi ekspresi MITF. *Microphthalmia-associated transcription*

factor berfungsi sebagai regulator utama biosintesis melanin karena mengatur transkripsi gen-gen penting dalam melanogenesis, termasuk *tyrosinase* (TYR), *tyrosinase related protein-1* (TYRP1), dan TYRP2, yang secara langsung berperan dalam produksi pigmen melanin pada melanosit.⁴⁴

2.3.2 Reseptor melanokortin 1 (MC1R)

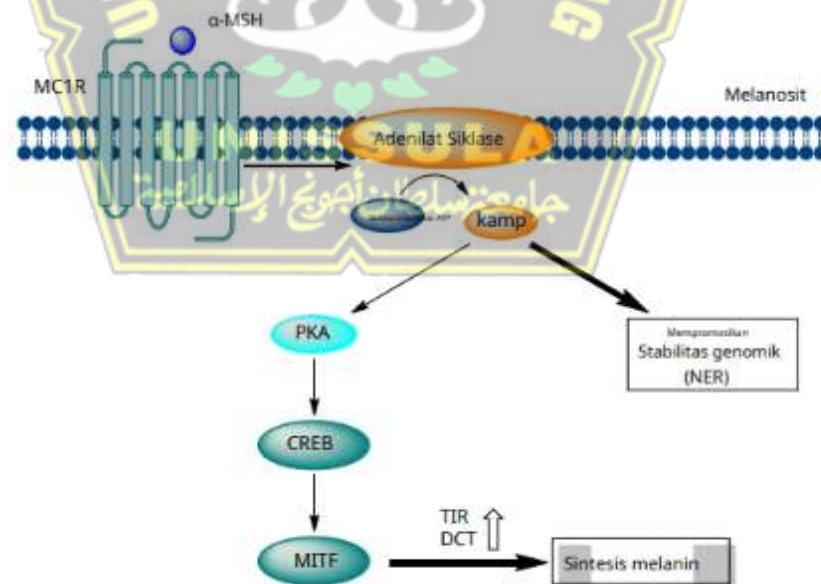
Reseptor melanokortin 1 (MC1R) merupakan salah satu dari lima sub tipe reseptor melanokortin yang termasuk dalam superkeluarga reseptor yang terhubung dengan protein G (GPCRs). Memiliki tujuh heliks α -transmembran (7TM). Reseptor ini terdiri dari 317 asam amino yang ditemukan pada membran sel melanosit dan memainkan peran penting dalam regulasi pigmentasi melalui aktivasi oleh ligan endogen seperti α -MSH dan ACTH (*adrenocorticotrophic hormone*).^{45,46}

Struktural MC1R memiliki berbagai fitur khas, termasuk situs glikosilasi yang terikat pada bagian N-terminal yang terletak di ekstraseluler, situs palmitoilasi pada bagian C-terminal intraseluler, serta motif konservatif DRY (Aspartat-Arginin-Tirosin) yang terletak di transmembran dan sangat penting dalam transduksi sinyal. yang diperlukan untuk penempatan reseptor ke membran plasma dan stabilitas struktural.^{45,47}

2.3.3 Jalur Pensinyalan

Jalur pensinyalan MC1R memegang peranan kunci dalam proses

melanogenesis serta perlindungan sel melanosit terhadap kerusakan akibat sinar ultraviolet.⁴⁶ Aktivasi jalur ini dimulai ketika ligan α -MSH berikatan dengan MC1R yang terletak pada membran sel melanosit. Interaksi ini mengaktifkan enzim adenilat siklase, yang mengubah ATP menjadi cAMP sebagai *second messenger*. Peningkatan kadar cAMP selanjutnya mengaktifkan protein kinase A (PKA), yang kemudian memfosforilasi faktor transkripsi CREB (*cAMP response element-binding protein*). CREB berperan dalam meningkatkan ekspresi MITF yaitu faktor regulasi utama dalam transkripsi gen-gen terkait sintesis melanin, termasuk *tyrosinase* dan *dopachrome tautomerase* (DCT). Proses ini berakhir pada peningkatan produksi melanin, khususnya eumelanin, yang memiliki kemampuan protektif terhadap kerusakan DNA akibat paparan UV.^{48,49}

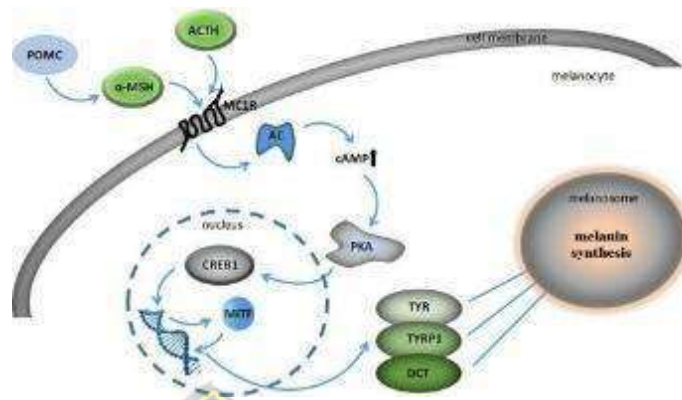


Gambar 2.4 Jalur pensinyalan MC1R dalam melanosit.⁴⁸

Jalur perbaikan DNA diaktivasi oleh cAMP, khususnya melalui mekanisme *nucleotide excision repair* (NER), yang berperan dalam menjaga stabilitas genomik melanosit dari kerusakan akibat stres oksidatif dan mutagenik. Dengan demikian, aktivasi MC1R tidak hanya berfungsi dalam pigmentasi kulit, tetapi juga berperan penting dalam pertahanan sel terhadap kerusakan lingkungan. Jalur MC1R – AMP – MITF melanin ini menjadi penting dan relevan dalam estetika medis maupun pengembangan terapi terhadap gangguan pigmentasi.^{50,51}

2.4. *Tyrosinase Related Protein 1* (TYRP1)

Tyrosinase Related Protein 1 (TYRP1) adalah salah satu enzim penting dalam jalur biosintesis melanin di kulit. TYRP1 mengubah *DHICA* menjadi eumelanin yang banyak ditemukan pada individu berkulit gelap. Eumelanin berfungsi sebagai pelindung alami karena mampu menyerap sinar ultraviolet (UV) dengan sangat efektif.^{46,52} Enzim TYRP1 bekerja bersama dua enzim lain, yaitu *tyrosinase* dan TYRP2 dalam satu kelompok enzim yang berperan dalam proses melanogenesis.⁵² Ketiganya dikendalikan oleh MITF, yaitu faktor transkripsi utama yang mengatur bagaimana sel penghasil melanin (melanosit) tumbuh, berkembang, dan menjalankan fungsinya dalam memproduksi pigmen kulit.⁵³ Penurunan ekspresi MITF telah terbukti mengubah profil ekspresi microRNA dan protein terkait tirosinase dalam melanosit, yang menunjukkan peran penting MITF dalam regulasi TYRP1 dan proses melanogenesis secara keseluruhan.⁵⁴



Gambar 2.5. Jalur pigmentasi Ilustrasi jalur pigmentasi pada kulit manusia.⁵⁴

Studi meta-analisis terhadap berbagai model hiperpigmentasi kulit manusia (*meliputi UV-induced pigmentation, post-inflammatory hyperpigmentation/PIH, long-lasting pigmentation/LLP, age spots/AS, dan perbedaan kulit etnis/ES*) hasil analisis menemukan bahwa TYRP1 merupakan salah satu dari 10 gen yang paling signifikan diekspresikan secara meningkat di kulit yang mengalami hiperpigmentasi.⁵¹

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

Exosome dari *mesenchymal stem cell* (MSC) adalah vesikel ekstraseluler berukuran 30-150 nm yang berperan dalam komunikasi antar sel. *Exosome* memiliki marker permukaan spesifik seperti CD63, CD81, dan CD9, yang digunakan untuk identifikasi dan isolasi. Berdasarkan ukurannya, *Exosome* MSC dibagi menjadi tiga yaitu *small exosome* (30-50 nm), *medium*

exosome (50-100 nm), dan *large exosome* (100-150 nm). *Exosome* MSC mengandung berbagai molekul bioaktif seperti miRNA, protein, dan lipida yang berkontribusi pada regenerasi jaringan, anti-inflamasi, dan modulasi imun, sehingga menjadikannya berpotensi besar dalam terapi medis.⁵⁵⁻⁵⁷

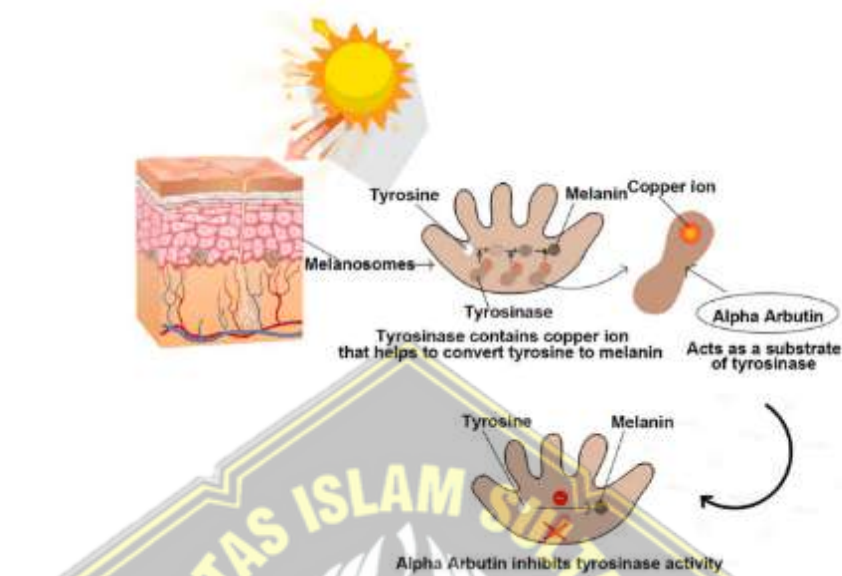
Exosome mengandung berbagai komponen aktif yang memiliki potensi terapeutik dalam penanganan hiperpigmentasi kulit. Salah satu komponen utama yang berperan adalah microRNA (miRNA), seperti miR-181a-5p, miR-199a.⁵⁸ Molekul-molekul ini diketahui mampu menekan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam jalur melanogenesis, termasuk MITF, TYR, dan TYRP1. Sehingga sintesis melanin dapat berkurang.⁵⁴ *Exosome* juga membawa *long non-coding* RNA (lncRNA) serta mRNA yang turut berkontribusi dalam proses regenerasi jaringan kulit.⁵⁹ Komponen protein di dalam *exosome*, seperti TGF- β 1, berperan dalam menurunkan aktivitas melanogenik melalui pengaturan ekspresi MITF. Protein antioksidan seperti SOD (*superoxide dismutase*) dan *catalase* membantu menetralkan radikal bebas, yang diketahui memicu peningkatan produksi melanin melalui aktivasi reseptor MC1R.⁶⁰ Di sisi lain, lipid penyusun *exosome* seperti *sphingomyelin* dan *ceramide* membantu menjaga integritas kulit dan meredakan inflamasi kronis yang menjadi pemicu hiperpigmentasi. Efek ini sangat relevan dalam mengatasi hiperpigmentasi yang umum terjadi pada individu dengan tipe kulit tertentu.^{60,61}

Beberapa studi ilmiah telah menunjukkan bahwa kondisi lingkungan dengan kadar oksigen rendah (hipoksia) ternyata dapat memengaruhi sel punca mesenkimal (*Mesenchymal Stem Cells*/MSCs), termasuk peningkatan kemampuan adhesi, proliferasi, serta regenerasi. Dalam kondisi kadar oksigen yang rendah ini, terjadi peningkatan sintesis molekul penting *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF), yang berperan sebagai faktor transkripsi utama dalam merespons stres akibat hipoksia. Aktivasi HIF dalam MSCs diketahui mampu merangsang produksi berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan, yang berkontribusi besar terhadap proses penyembuhan jaringan dan regenerasi sel.⁶²⁻⁶⁴

2.6 Alpha Arbutin

Arbutin secara efektif dapat mengurangi produksi melanin dengan menghambat enzim tyrosinase. Arbutin terdapat dalam dua isoform yaitu α -arbutin (4-dihidroksifenil- α -D-glukopiranosida) dan β -arbutin (4-dihidroksifenil- β -D-glukopiranosida). Beta arbutin umumnya diekstrak dari daun berbagai tanaman dan kulit buah. Sedangkan alpha arbutin tidak terdapat secara alami dan dapat disintesis secara biologis oleh mikroba enzim atau mikroorganisme. Alpha arbutin lebih efisien dalam menghambat aktivitas tyrosinase daripada β -arbutin.¹⁶

2.6.1 Mekanisme Kerja Alpha arbutin



Gambar 2.6 Mekanisme alpha arbutin untuk pencerah kulit.⁶¹

Paparan sinar ultraviolet (UV) terutama UVB pada sel melanosit di lapisan basal epidermis distimulasi untuk menghasilkan melanin untuk melindungi kulit dari efek radiasi ultraviolet (UV) yang rusak.⁹ Dalam proses ini, asam amino tirosin diubah menjadi melanin melalui aksi enzim tirosinase yang berada dalam melanosom, yaitu organel di dalam melanosit. Tirosinase merupakan enzim kunci yang memerlukan ion tembaga (Cu^{2+}) sebagai kofaktor penting untuk mengkatalisis konversi tirosin menjadi melanin. Aktivitas tirosinase dapat dihambat oleh agen depigmentasi seperti Alpha arbutin. Alpha Arbutin bekerja dengan dua cara utam, pertama sebagai substrat kompetitif terhadap tirosinase, sehingga mengganggu proses enzimatik konversi tirosin menjadi melanin. Kedua secara langsung

menghambat aktivitas tirosinase, sehingga mengurangi produksi melanin.^{65,66}

2.7 Niacinamide

Niacinamide (dikenal sebagai *nicotinamide*, *nicotinic acid amide*, atau *3-pyridinecarboxamide*) adalah bagian dari kelompok vitamin B. Niacinamide dapat ditemukan dalam bentuk bebas maupun terikat pada jaringan tumbuhan dan hewan, terutama sebagai bagian dari *nikotinamida-adenin dinukleotida* (NAD) dan *nikotinamida-adenin dinukleotida fosfat* (NADP).⁶⁷

Niacinamide dapat digunakan pada hiperpigmentasi, mengurangi infeksi kulit seperti jerawat dan dermatitis, menjaga kelembapan kulit, perlindungan kulit, memperkuat skin barrier, mengurangi produksi sebum, membantu mengurangi kemerahan, iritasi, dan pembengkakan, terutama pada kondisi kulit yang mengalami inflamasi.⁶⁸

Pada beberapa penelitian niacinamide memiliki banyak efek terhadap sintesis melanin. Niacinamide bekerja menghambat transfer melanosome dari melanosit ke keratinosit secara reversible, sehingga tidak menyebar secara efektif ke lapisan kulit terluar. Niacinamide secara konsisten menurunkan kadar melanin dan pigmentasi kulit. Hal ini menunjukkan bahwa interaksi antara melanosit dan keratinosit sangat

penting dalam proses pigmentasi kulit, serta niacinamide dapat memengaruhi pigmentasi secara tidak langsung melalui keratinosit.⁶⁷

Niacinamid menghambat transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit dan merupakan agen antiinflamasi yang memiliki efek mencerahkan kulit. Niacinamide dapat menembus kulit dengan baik dan mencapai tingkat penyerapan maksimum dalam waktu 48–72 jam. Dalam kasus hiperpigmentasi penggunaan niacinamide dengan konsentrasi 4% terbukti dapat mengurangi kandungan melanin di epidermis serta menekan inflamasi di dermis. Hal ini membantu mengatasi hiperpigmentasi secara klinis dan membuat warna kulit lebih merata.⁶⁹

2.8 Efek kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) Alpha Arbutin dan Niacinamide Terhadap Ekspresi *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R) dan *TYRP1*

Hiperpigmentasi merupakan kondisi yang terjadi akibat produksi melanin yang berlebihan, terutama akibat paparan sinar ultraviolet (UV) secara terus-menerus.⁵ Paparan radiasi UV dapat mengaktifkan jalur pensinyalan cAMP, yang kemudian mengaktifasi protein kinase A (PKA) dan transcription factor CREB, hingga akhirnya merangsang aktivasi MITF.² Salah satu pengatur utama dalam proses melanogenesis adalah reseptor MC1R, yang terletak pada membran sel melanosit. Reseptor MC1R banyak diekspresikan di sel melanosit yang berperan penting dalam regulasi pigmentasi. Aktivasi MC1R oleh hormon α -MSH akan merangsang

produksi melanin, khususnya eumelanin. *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) merupakan faktor transkripsi kunci yang mengatur proses sintesis melanin, pengaturan proliferasi, diferensiasi, dan distribusi melanosit. Studi menunjukkan bahwa ketika ekspresi MITF ditekan (silencing) pada sel melanosit, ekspresi protein *tyrosinase* dan TYRP1 mengalami penurunan yang signifikan. Sebaliknya, ekspresi TYRP2 akan meningkat secara signifikan.^{2,3,12,70}

Penelitian tentang proses pigmentasi kulit telah menunjukkan bahwa *exosome* sangat penting dalam mengendalikan ekspresi DNA. *Exosome* mengandung berbagai komponen aktif yang memiliki potensi terapeutik dalam penanganan hiperpigmentasi kulit. Salah satu komponen utama yang berperan adalah microRNA (miRNA), seperti miR-181a-5p, miR-199a.⁵⁸ Molekul-molekul ini diketahui mampu menekan ekspresi gen yang terlibat dalam jalur melanogenesis, termasuk MITF, TYR, dan TYRP1. Sehingga sintesis melanin dapat berkurang.⁵⁴ *Exosome* juga berperan dalam merangsang migrasi melanosit menuju area kulit. Dengan demikian, *exosome* tidak hanya berkontribusi terhadap regulasi gen pigmentasi dan produksi melanin, tetapi juga berperan penting dalam pengaturan perkembangan dan pergerakan melanosit ke lokasi target di kulit.^{58-61,64}

Alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% dapat mengurangi pigmentasi kulit karena memiliki pengaruh penghambatan terhadap proses melanogenesis yang lebih aman dibandingkan dengan hidrokuinon. Alpha arbutin mampu mengurangi produksi melanin dengan cara menghambat

aktivitas enzim tirosinase. Niacinamide menghambat transfer melanosome dari dalam melanosit ke keratinosit.^{16,65,68,69}

Kombinasi *exosome*, alpha arbutin dan niacinamide dapat memberikan efek sinergis pada pengaturan ekspresi MC1R dan TYRP1 dalam modulasi hiperpigmentasi. *Exosome* berperan penting dalam pengaturan ekspresi gen-gen kunci dalam melanogenesis, termasuk MC1R dan TYRP1, serta mendorong aktivasi, diferensiasi, dan migrasi melanosit ke area target. Sementara itu, alpha arbutin menghambat aktivitas enzim tirosinase secara langsung, sehingga menurunkan biosintesis melanin. Niacinamide bekerja dengan cara menghambat transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit, sehingga mengurangi distribusi pigmen ke lapisan epidermis. Kombinasi ketiganya memberikan pendekatan yang komprehensif dan menjanjikan dalam terapi hiperpigmentasi.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

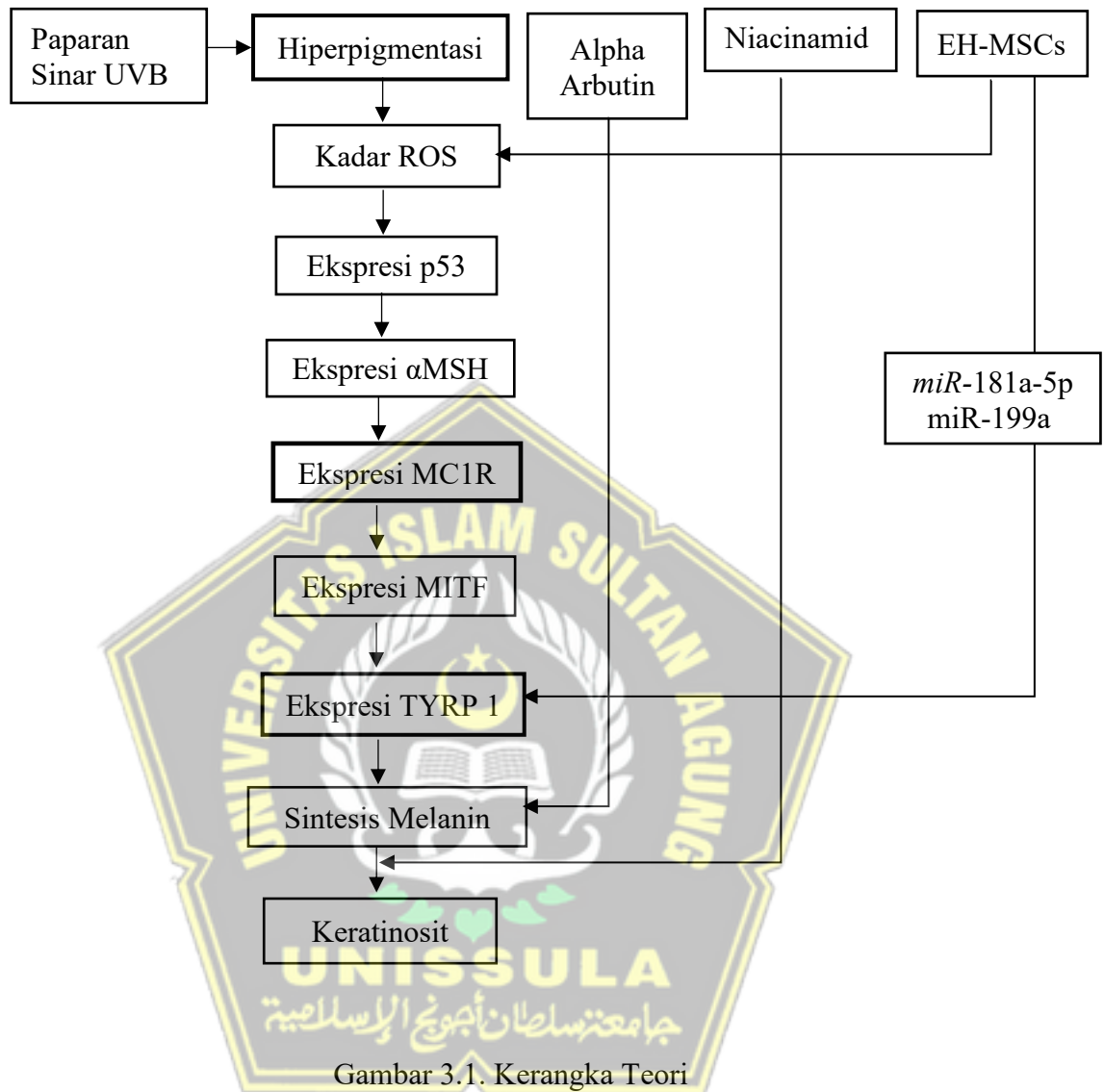
Hiperpigmentasi merupakan suatu kondisi kelainan pada kulit yang ditandai dengan munculnya area berwarna lebih gelap akibat akumulasi melanin secara berlebihan. Salah satu faktor penting yang berperan dalam peningkatan sintesis melanin adalah radiasi UVB, yang mampu menstimulasi aktivitas melanosit secara berlebihan.^{4,11}

Hiperpigmentasi juga dapat disebabkan oleh pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang berperan sebagai indikator stres oksidatif, serta aktivasi jalur pensinyalan p53 sebagai pengatur utama respons sel terhadap kerusakan DNA. Kehadiran ROS dapat menimbulkan stres oksidatif dan kerusakan pada sel-sel endogen, sehingga menginisiasi mekanisme adaptif berupa peningkatan produksi melanin sebagai bentuk perlindungan kulit terhadap kerusakan lebih lanjut. Jalur p53 berperan dalam meningkatkan ekspresi POMC, prekursor hormon α -MSH. Aktivitas melanogenesis sangat dipengaruhi oleh keberadaan hormon α -MSH yang mengaktifasi reseptor melanokortin 1 (MC1R) yang terdapat pada membran sel melanosit. Aktivasi MC1R akan meningkatkan kadar cAMP intraseluler dan menginduksi aktivasi protein kinase A (PKA), sehingga memicu ekspresi faktor transkripsi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF) yang mengatur ekspresi berbagai gen kunci dalam biosintesis

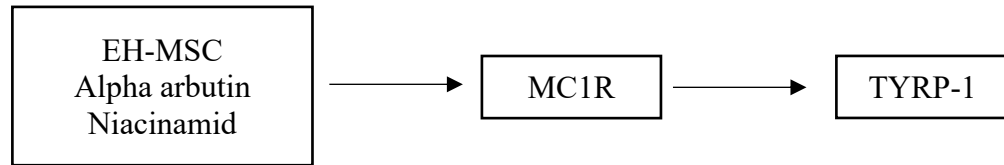
melanin, termasuk *tyrosinase*, TYRP1, dan TYRP2. Akumulasi enzim-enzim tersebut meningkatkan produksi melanin pada melanosome yang kemudian ditransfer ke keratinosit, sehingga menghasilkan peningkatan pigmentasi yang tampak secara klinis sebagai hiperpigmentasi.^{12,13,18,21,61,71}

Exosome berfungsi sebagai mediator komunikasi antara keratinosit dan melanosit dalam jalur melanogenesis dan mungkin juga terlibat dalam transportasi melanosom dengan mengatur kelangsungan hidup melanosit dan ekspresi protein enzim seperti tirosinase (TYR), protein terkait tirosinase 1 (TYRP1), protein terkait tirosinase-2 (TYRP2), dan *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) dalam melanogenesis. *Exosome* memiliki peran dalam menekan jalur melanogenesis melalui modulasi ekspresi POMC, α -MSH, dan MC1R serta menurunkan kadar ROS, sehingga mereduksi rangsangan awal dari jalur pigmentasi. *Exosome* ini membawa miRNA seperti miR-181a-5p dan miR-199a, yang diketahui dapat mengatur ekspresi protein kunci dalam pigmentasi.^{28-30,72}

Alpha Arbutin sebagai inhibitor kompetitif enzim tirosinase dan menurunkan ekspresi TYR, TYRP1, dan TYRP2, sehingga langsung menghambat tahap akhir sintesis melanin. Sedangkan Niacinamide bekerja dengan menghambat transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit, yang secara efektif mencegah melanin yang sudah terbentuk berpindah ke lapisan atas kulit. Selain itu, niacinamide memiliki efek anti inflamasi dan dapat memperkuat skin barrier, sehingga mendukung pencegahan hiperpigmentasi sekunder akibat inflamasi.^{1-3,32}



3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Terdapat pengaruh kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi MC1R dan TYRP1 pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB.

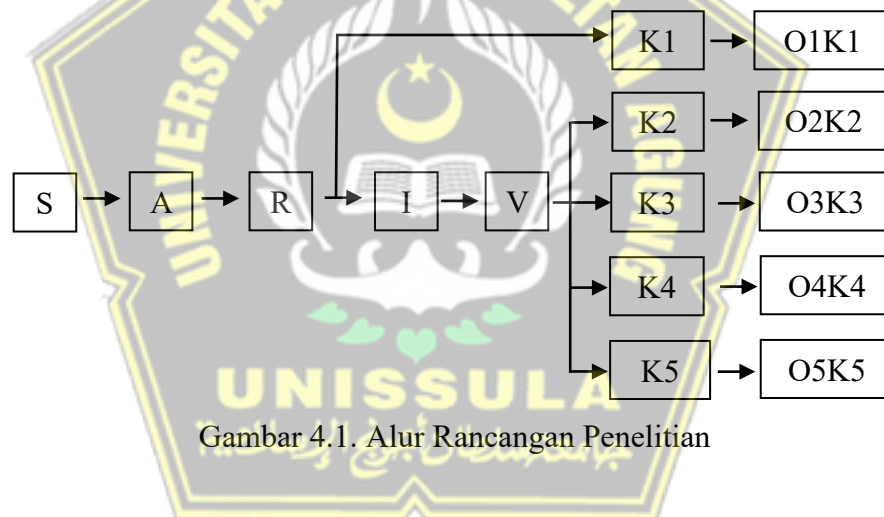


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *post-test only control group* dengan rancangan acak lengkap. Setiap kelompok mendapatkan enam kali ulangan perlakuan. Subjek penelitian adalah mencit jantan galur C57BL/6 dengan berat badan 20–25 gram.



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel

A : Adaptasi

R : Randomisasi

I : Induksi UVB

V: Validasi

K1 : Mencit sehat tanpa paparan UVB.

K2 : Kontrol Negatif (Mencit dengan diberi NaCl 0,9%)

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

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

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 MC1R dan TYRP-1 kelompok K1

O2K2 : Observasi ekspresi MC1R dan TYRP-1 kelompok K2

O3K3 : Observasi ekspresi MC1R dan TYRP-1 kelompok K3

O4K4 : Observasi ekspresi MC1R dan TYRP-1 kelompok K4

O5K5 : Observasi ekspresi MC1R dan TYRP-1 kelompok K5

4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel Penelitian

4.2.1.1 Variabel bebas

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

4.2.1.2 Variabel Terikat

Ekspresi *melanocortin 1 receptor* (MC1R) dan ekspresi

tyrosinase related protein 1 (TYRP1)

4.2.2 Definisi Operasional

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

EH-MSCS (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*) adalah *exosome* yang berasal dari MSC dikultur dalam kondisi hipoksia pada kadar oksigen 5% dengan dosis 200 μ l. EH-MSCs diberikan dengan cara injeksi subkutan pada kulit mencit C57BL/6 sebanyak dua kali pada hari ke satu dan keempat perlakuan pada K4 dan K5.

Skala : Rasio

4.2.2.2 Ekspresi *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R)

Ekspresi MC1R adalah tingkat ekspresi mRNA pada MC1R dari jaringan kulit mencit C57BL/6. Pengukuran diambil dari jaringan kulit mencit C57BL/6 yang telah terpapar sinar UVB selama 14 hari dan dilakukan perlakuan selama 7 hari pada K1 sampai K5,, ekspresi MC1R dianalisis menggunakan metode qRT-PCR

Skala: rasio

4.2.2.3 Ekspresi *Tyrosinase Related protein 1* (TYRP1)

Ekspresi TYRP1 adalah tingkat ekspresi mRNA pada TYRP1 dari jaringan kulit mencit C57BL/6. Pengukuran diambil dari jaringan kulit mencit C57BL/6 yang telah terpapar sinar UVB selama 14 hari dan dilakukan perlakuan selama 7 hari pada K1 sampai K5, ekspresi

TYRP1 dianalisis menggunakan metode qRT-PCR

Skala: rasio

4.2.2.4 Alpha Arbutin dan Niacinamide

Alpha Arbutin 5% dan niacinamide 4% dengan sediaan topikal, diberikan sebanyak 0,3 gram selama 7 hari pada K3, K4, dan K5

Skala: rasio

4.3 Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1 Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan mencit jantan galur C57BL/6 berusia 2–3 bulan dengan berat badan 20–25 gram, yang telah dinyatakan sehat serta layak digunakan sebagai hewan uji 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.

4.3.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.3.3.1 Kriteria Inklusi

Mencit jantan galur C57BL/6 berusia 2-3 bulan, dengan berat badan 20-25 gram, aktif bergerak, nafsu makan normal, tidak memiliki luka atau kelainan kulit.

4.3.3.2 Kriteria Eksklusi

Mencit jantan galur C57BL/6 dengan kesehatan buruk atau sakit selama masa adaptasi. Penurunan berat badan lebih dari 20%, menunjukkan tanda- tanda stres berat seperti perubahan perilaku selama masa adaptasi.

4.3.3.3 Kriteria Drop Out

Mencit mati atau infeksi selama penelitian, tidak menyelesaikan seluruh rangkaian perlakuan sesuai jadwal penelitian.

4.3.4 Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan dengan metode *Randomized Sampling*. Mencit jantan galur C57BL/6 selanjutnya dibagi menjadi 5 kelompok yaitu K1 sebagai mencit sehat tanpa paparan UVB, K2 sebagai kontrol negatif mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi NaCl, K3 sebagai kontrol positif mencit dengan paparan UVB dan perlakuan topikal alpha arbutin 5% dan topikal niacinamide 4% masing-masing 0,3 gram, K4 sebagai kelompok perlakuan yaitu mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi *exosome* 200µl, K5 sebagai kelompok perlakuan yaitu mencit dengan paparan UVB dan perlakuan topikal alpha arbutin 5%, niacinamide 4% masing- masing 0,3 gram dan perlakuan injeksi *exosome* 200µl.

4.3.5 Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung berdasarkan sampel eksperimental dari Federer. Rumus Federer yaitu: $(t-1)(n-1) \geq 15$, dari rumus tersebut didapat hasil n adalah 5. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya kelompok

perlakuan yaitu 5 dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan. Sehingga sampel yang digunakan adalah 5 ekor per kelompok kemudian diambil secara acak. Dibagi menjadi 5 kelompok sehingga jumlahnya adalah 25 ekor mencit ditambah cadangan 1 kelompok dan ditambah validasi kelompok sehat dan sakit yaitu 4 ekor menjadi total 34 ekor.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

Penelitian ini menggunakan UVB light (*broadband* dengan *peak emission* pada 302nm) untuk membuat hewan model hiperpigmentasi. Proses validasi MSC dan EH-MSCs dilakukan dengan instrumen *flowcytometer* dan mikroskop *inverted*. Sementara itu, peralatan pendukung yang digunakan mencakup spuit 1 cc, sarung tangan, jarum, 30G, spatula, timbangan digital, mikropipet, tabung sentrifus, wadah kultur sel, botol, dan lampu UV., pinset untuk jaringan, gunting jaringan, pisau cukur, tabung *Eppendorf* dan kandang pemeliharaan.

4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk perlakuan subjek penelitian adalah alkohol 70%, NaCl 0,9%, krim alpha arbutin 5%, niacinamide 4%, EH-MSCs 200µl. Bahan yang digunakan untuk analisis PCR adalah reagen ekstraksi RNA, enzim reverse transcriptase untuk sintesis cDNA, serta master mix PCR lengkap dengan *Primer Forward* dan *Reverse* MC1R dan

TYRP1. Zat pewarna untuk *masson fontana*. Bahan lain pakan mencit.

4.5 Cara Penelitian

4.5.1 Perolehan *Ethical Clearance*

Pengajuan *ethical clearance* penelitian dilakukan kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

Exosome hypoxia mesenchymal stem cell didapatkan dari SCCR yang sudah tervalidasi dengan marker khusus kriteria *exosome*. Sediaan *exosome* sudah dalam bentuk siap pakai dalam vial berisi *exosome* sebanyak 1,5ml.

4.5.3 Paparan Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Penelitian

Mencit terlebih dahulu diadaptasi selama lima hari sebelum perlakuan. Bagian punggung dicukur menggunakan clipper hingga bersih dengan luas area 5×5 cm. Mencit dibagi menjadi 5 kelompok yaitu K1, K2, K3, K4 dan K5. Kelompok K1 tidak diberikan paparan UVB, sedangkan K2, K3, K4, K5 dilakukan iradiasi menggunakan sinar UVB (broadband, *peak emission* 302 nm) dengan dosis 180 mJ/cm^2 , tiga kali per minggu (hari ke-1, ke-3, dan ke-5) selama 10 menit, yang dilakukan selama 14 hari.. Setelah periode paparan UVB, dilakukan validasi makroskopis dan mikroskopis dengan *masson fontana* pada mencit. Pada kelompok kontrol negatif (K2) diberikan NaCl 0,9%, kelompok kontrol positif (K3) diberikan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram selama

tujuh hari. Kelompok K4 mencit disuntikkan *exosome* sebanyak dua kali pada hari ke-1 dan ke-4 setelah validasi dengan dosis 200 μ l. pada K5 diberikan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing sebanyak 0,3 gram selama tujuh hari dan injeksi *exosome* 200 μ l hari ke-1 dan ke-4 setelah validasi hiperpigmentasi.

4.5.4 Terminasi dan Pengambilan Jaringan

- a. Terminasi mencit dengan cara dislokasi servikalis.
- b. Jaringan kulit dikoleksi dan dimasukkan ke dalam *cryotube* bebas RNAase, kemudian disimpan dalam larutan RNA later pada suhu -80°C
- c. Setelah mencit mati, sampel kulit dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam *cryotube* bebas RNAase, lalu disimpan pada suhu -80°C dalam larutan RNA later untuk mencegah degradasi RNA.

4.5.5 Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA

- a. Jaringan kulit difiksasi menggunakan formalin 10% kemudian diproses menjadi blok paraffin
- b. Sebanyak 100mg jaringan kulit yang telah disimpan dalam RNA later dipotong menjadi fragmen kecil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 50 μ l RNA Iso Plus.
- c. Potongan jaringan kulit dihancurkan menggunakan *micropestle*, kemudian ditambahkan kembali 50 μ l RNA Iso Plus dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.
- d. Sebanyak 20 μ l kloroform ditambahkan ke dalam larutan, kemudian

divortex hingga campuran berwarna putih keruh menyerupai susu.

- e. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 2–3 menit, sampel disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, menghasilkan tiga fase: fase cair atas mengandung RNA, fase tengah semi-padat terdiri dari DNA, dan fase bawah berisi debris seluler.
- f. Fase atas yang berisi RNA dipindahkan ke tabung baru, volumenya diukur, lalu dicampur dengan isopropanol dalam jumlah yang sama.
- g. Tabung *Eppendorf* digoyangkan hingga terbentuk fibril putih lalu disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang hingga tampak pelet berwarna putih pada dasar tabung.
- h. Pelet kemudian dibilas dengan penambahan 100 µl etanol 70% dalam larutan DEPC, dihomogenisasi secara perlahan, lalu disentrifugasi kembali pada kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.
- i. Supernatan dihilangkan, pelet RNA ditambahkan dengan 30–50 µl DEPC dan diinkubasi pada 55°C selama 10 menit untuk isolasi total RNA. Selanjutnya, RNA disimpan pada -80°C setelah dilakukan pengukuran kuantitas menggunakan Nanodrop dan distandarisasi pada konsentrasi 3000 ng.
- j. Untuk sintesis cDNA, Campuran A disiapkan dengan memasukkan RNA yang telah terukur, 1 µl oligo(dT), serta PCR water hingga mencapai volume 10 µl, kemudian diinkubasi pada 70°C selama 5 menit.
- k. Campuran A kemudian ditambahkan dengan Campuran B yang terdiri dari

4 µl 5X buffer, 5 µl DEPC-H₂O, dan 1 µl ReverTra Ace. Proses inkubasi dilakukan secara bertahap pada 25°C selama 5 menit, 42°C selama 50 menit, dan 85°C selama 5 menit untuk menghasilkan cDNA yang siap digunakan.

4.5.6 Prosedur Pembuatan Preparat dan Pembacaan Hiperpigmentasi

- a. Jaringan kulit difiksasi menggunakan formalin 10% kemudian diproses menjadi blok parafin.
- b. Preparat jaringan diwarnai menggunakan pewarnaan *Masson-Fontana*.
- c. Ketebalan epidermis, mulai dari lapisan basal hingga stratum korneum, diukur menggunakan mikroskop yang dilengkapi mikrometer okuler.
- d. Analisis ketebalan jaringan dilakukan dengan bantuan perangkat lunak ImageJ.
- e. Data hasil pengukuran selanjutnya dibandingkan dengan kelompok kontrol dan jaringan kulit mencit sehat.

4.5.7 Prosedur Pembacaan Ekspresi dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

- a. Analisis ekspresi mRNA MC1R (*Melanocortin 1 Receptor*) dilakukan menggunakan RT-PCR. Reaksi PCR disiapkan dengan mencampurkan 3 µl cDNA sampel, 12,5 µl Taq master mix yang mengandung dNTPs, *Taq DNA polymerase*, *reaction buffer*, dan MgCl₂, 0,6 µl primer spesifik untuk gen MC1R (*forward* 5'-GTGCTGGTTGGTGATAGCCATC-3', *reverse*

5'-TGCTGACACTTACCATCAGGT-3'), serta 8,3 μ l *Nuclease Free Water*.

- b. Ekspresi mRNA TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*) dianalisis menggunakan RT-PCR. Reaksi PCR disiapkan dengan mencampurkan 3 μ l cDNA sampel, 12,5 μ l Taq master mix yang mengandung dNTPs, *Taq DNA polymerase*, *buffer reaksi*, dan $MgCl_2$, 0,6 μ l primer spesifik TYRP1 (*forward* 5'-ATGGAACGGGAGGACAAAC-3', *reverse* 5'-TCCTGACCTGGCCATTGAAC-3'), serta 8,3 μ l *Nuclease Free Water*.
- c. Gen *housekeeping* GAPDH digunakan sebagai referensi internal untuk normalisasi ekspresi gen, dengan primer *forward* 5'-TATGACTCTACCCACGGCAAGT-3' dan *reverse* 5'-ATACTCAGCACCAGCATCACC-3'.
- d. Hasil amplifikasi PCR dievaluasi menggunakan teknologi qRT-PCR berbasis Illumina.
- e. Rasio peningkatan ekspresi gen dibandingkan dengan gen *housekeeping* dihitung menggunakan EcoStudy untuk menilai perbedaan ekspresi relatif.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

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

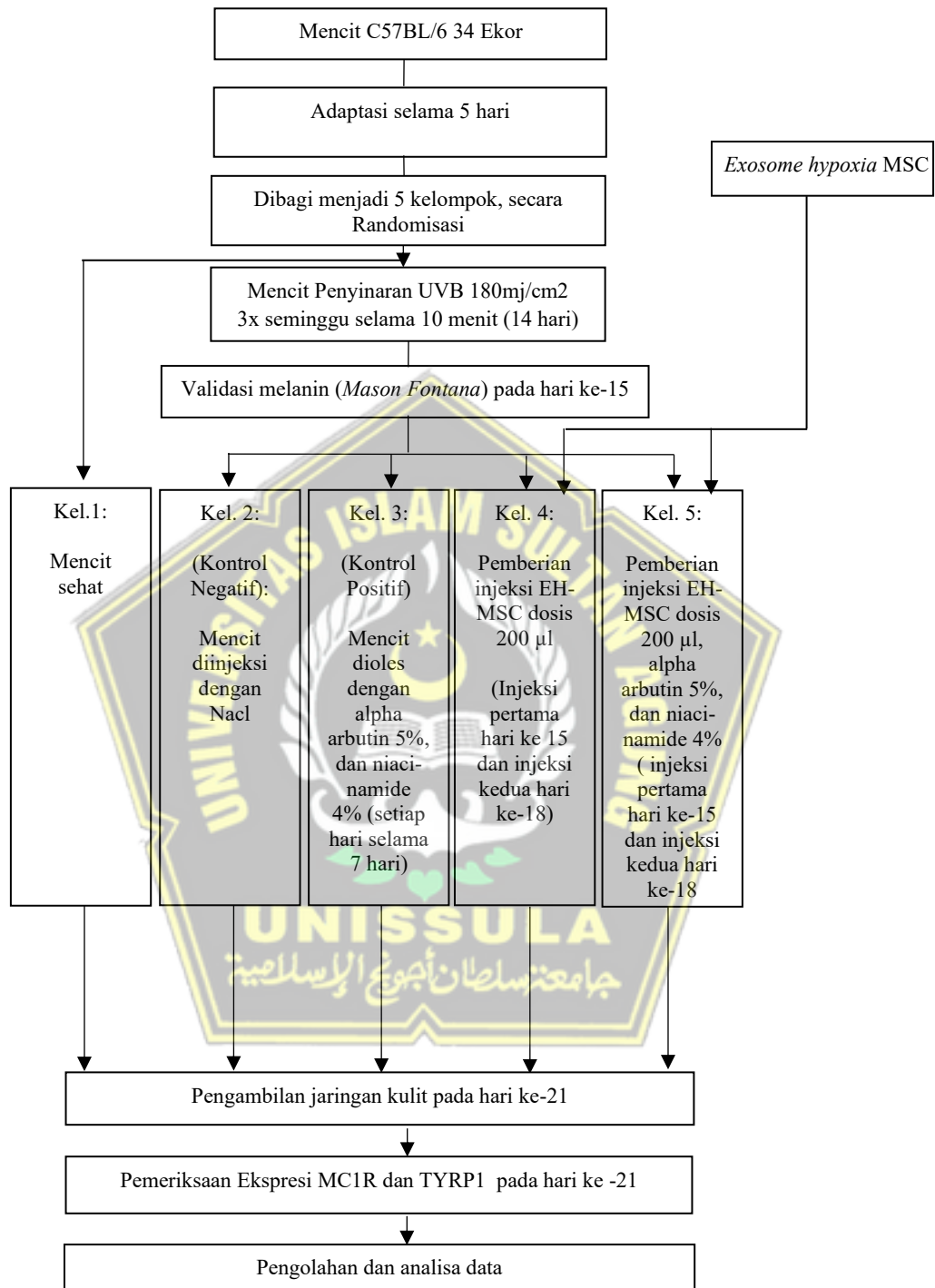
4.7 Analisa Data

Analisis distribusi data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dengan hasil distribusi data normal ($p > 0,05$), uji homogenitas menggunakan *Leuvene Tes*

dengan hasil data tidak homogen pada ekspresi MC1R ($P < 0,05$) dan data homogen pada ekspresi TYRP1 ($P > 0,05$), dilanjutkan uji *One-Way ANOVA* didapatkan hasil terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) diantara semua kelompok penelitian, kemudian dilakukan uji *Post Hoc Tamhane* untuk ekspresi MC1R dan dilakukan uji *post Hoc LSD* untuk ekspresi TYRP1.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) 200µl, alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% terhadap ekspresi MC1R dan TYRP1 pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang diinduksi Sinar UVB. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia pada bulan Mei 2025. Penelitian eksperimental *in vivo* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* dengan menggunakan 30 ekor mencit C57BL/6 sebagai subjek penelitian yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Kelompok 1 mencit sehat tanpa paparan UVB, kelompok 2 kontrol negatif mencit dengan diberi NaCl 0,9%, kelompok 3 kontrol positif mencit dengan topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing- masing sebanyak 0,3 gram, kelompok 4 mencit dengan paparan UVB dan perlakuan injeksi *exosome* 200 µl, kelompok 5 mencit dengan paparan UVB dan perlakuan topikal alpha arbutin 5%, niacinamide 4% masing- masing sebanyak 0,3 gram dan perlakuan injeksi *exosome* 200 µl.

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

Mesenchymal stem cell diisolasi di Laboratorium SCCR Semarang Indonesia, dengan menggunakan tali pusat mencit yang diperoleh pada usia

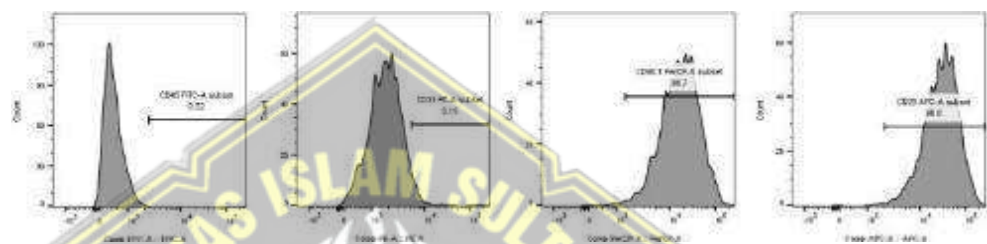
kehamilan 21 hari sebagai sumber utama. Proses isolasi diikuti dengan kultur sel dalam flask kultur yang berisi media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Setelah mencapai pasase kelima, dilakukan analisis morfologi sel yang menunjukkan adanya sel-sel dengan bentuk menyerupai *spindle* (memanjang) yang tampak melekat pada permukaan dasar flask saat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x, yang menunjukkan karakteristik khas *mesenchymal stem cell* yang sehat dan aktif, Gambaran ini terlihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1. Morfologi MSC

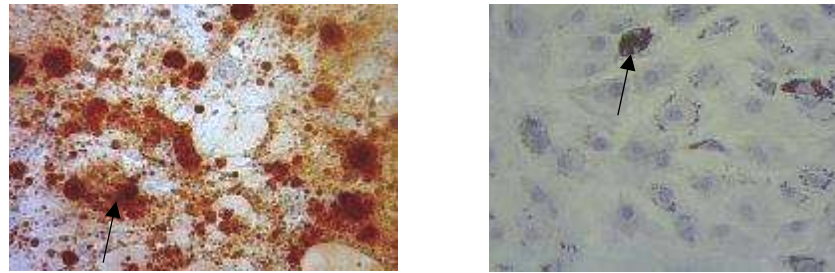
Validasi identitas *mesenchymal stem cells* (MSC) dilakukan melalui analisis *surface marker* menggunakan metode *flow cytometry*, yang berfungsi untuk memastikan kemurnian populasi sel dan membedakannya dari sel hematopoietik maupun sel endotelial. Mengacu pada kriteria *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), MSC harus mengekspresikan secara dominan penanda permukaan positif seperti CD90 dan CD29, serta menunjukkan ekspresi rendah atau negatif terhadap penanda permukaan hematopoietik (CD45) dan endotelial (CD31). Hasil analisis menunjukkan bahwa sel hasil kultur memiliki ekspresi CD90

sebesar 98,7% dan CD29 sebesar 98,8%, sedangkan ekspresi CD45 (0,52%) dan CD31 (5,15%) terdeteksi dalam kadar yang sangat rendah dapat dilihat pada gambar 5.2. Temuan ini mengindikasikan bahwa sel yang diisolasi dari jaringan tali pusat memenuhi karakteristik fenotipik MSC sebagaimana ditetapkan oleh ISCT, sehingga layak digunakan untuk aplikasi penelitian ini.



Gambar 5.2 Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90 dan CD29.

Penelitian ini juga mengkonfirmasi kemampuan diferensiasi multipotent dari MSC menjadi berbagai tipe sel dewasa, seperti osteosit dan adiposit, melalui paparan media induksi diferensiasi yang spesifik. Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa MSC berdiferensiasi menjadi osteosit yang ditandai oleh endapan kalsium menggunakan pewarnaan Alizarin Red S, dan diferensiasi menjadi adiposit yang ditunjukkan dengan adanya akumulasi lipid melalui pewarnaan Oil Red O ditunjukkan pada gambar 5.3.

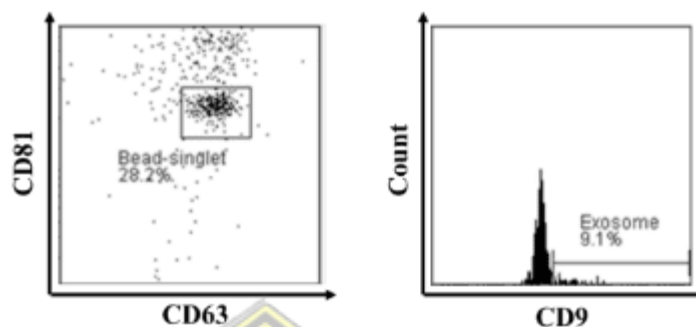


Gambar 5.3. Diferensiasi MSCs.

- (A) MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin red s dan
 (B) MSCs berdiferensiasi menjadi Adiposit pada pewarnaan oil red
 (ditunjukkan dengan panah hitam, perbesaran 40x).

Setelah proses validasi, sel punca mesenkimal (MSC) ditempatkan di dalam *chamber* hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam. Teknik *Tangential Flow Filtration* (TFF) digunakan untuk mengumpulkan dan memurnikan media kultur yang mengandung *exosome* yang bekerja bergantung pada perbedaan berat molekul untuk mengisolasi fraksi yang mengandung *exosome* didapatkan fraksi berukuran 100 hingga 500 kDa. Hasil analisis kuantitatif menunjukkan bahwa medium tersebut mengandung *exosome* dengan konsentrasi sebesar 0,75 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ atau setara dengan 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Validasi lebih lanjut terhadap Hypoxia MSCs dilakukan melalui analisis *flow cytometry* untuk memastikan keberadaan marker *exosome*, yang dikonfirmasi melalui ekspresi CD63, CD81, dan CD9. Data *flow cytometry* menunjukkan bahwa diagram CD63 dan CD81 memiliki populasi *bead-single* sebesar 28,2%, sementara histogram CD9 memperlihatkan tingkat ekspresi *exosome* sebesar 9,1%. Ekspresi ketiga

marker tersebut menegaskan keberhasilan isolasi sekaligus karakterisasi *exosome* dari EH-MSC, sebagaimana ditampilkan pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Hasil Analisis Kadar *Exosome* menggunakan marker CD6, CD81 dan CD9

5.1.2. Validasi Makroskopis dan Histologi Jaringan Kulit Mencit C57BL/6 Model Hiperpigmentasi

Validasi makroskopis dilakukan untuk memastikan bahwa paparan sinar ultraviolet B (UVB) mampu menginduksi terjadinya hiperpigmentasi pada kulit mencit C57BL/6. Validasi ini tidak hanya bertujuan untuk membuktikan keberhasilan induksi model, tetapi juga untuk mendokumentasikan perubahan morfologis yang dapat diamati secara visual sebagai indikator terbentuknya kondisi patologis yang diinginkan. Proses validasi dilakukan dengan membandingkan kondisi kulit mencit C57BL/6 sehat dengan kulit mencit C57BL/6 yang telah dipaparkan sinar UVB. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kulit mencit kelompok kontrol sehat memiliki warna merah muda pucat, dengan permukaan

epidermis yang tampak utuh, tidak adanya perubahan warna atau bercak gelap dan tidak menunjukkan tanda-tanda aktivasi melanogenesis ditunjukkan pada gambar 5.5 (A). Sedangkan pada kulit mencit yang diinduksi dengan paparan UVB pada gambar 5.5 (B) menunjukkan perubahan warna kulit menjadi lebih gelap dan merata pada area perlakuan, adanya bercak gelap atau perubahan kontras dan penebalan pada permukaan kulit, sehingga mengindikasikan peningkatan produksi dan deposisi melanin sebagai respon adaptif terhadap stres oksidatif akibat radiasi UVB. Perbedaan visual yang jelas antara mencit sehat dan kelompok yang telah diberikan sinar UVB ini menjadi indikator makroskopik keberhasilan induksi hiperpigmentasi.



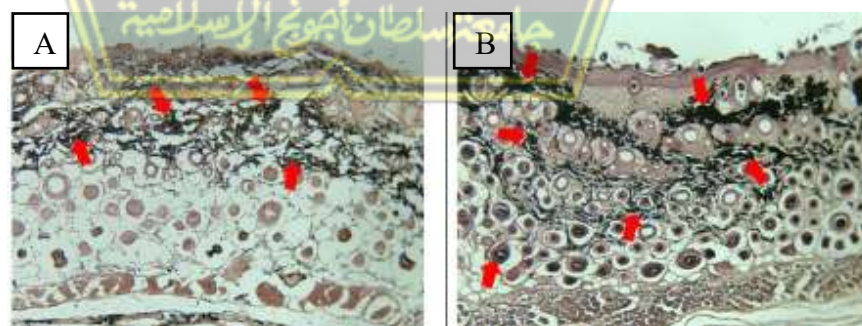
Sehat

Hiperpigmentasi

Gambar 5.5. Makroskopis Jaringan Kulit Sehat dan Jaringan Kulit Setelah dipapar UVB pada mencit C57BL/6

Gambaran secara mikroskopis dengan pewarnaan *masson fontana* dengan pembesaran 100x didapatkan pada kelompok sehat pada gambar 5.6 (A) menunjukkan struktur kulit yang teratur dengan distribusi melanin minimal, yang terbatas di lapisan basal epidermis dan ditunjukkan dengan

anak panah merah. Sementara itu, pada kelompok yang terpapar UVB gambar 5.6 (B) tampak lesi hiperpigmentasi berupa akumulasi melanin berwarna cokelat kehitaman yang menyebar secara tidak merata di seluruh lapisan epidermis dan sebagian dermis, ditandai oleh anak panah merah. Terlihat juga pelebaran dan ketidakjelasan batas antara epidermis dan dermis, disertai degenerasi dan pencairan sel basal. Keberadaan melanofag berbentuk fusiform teridentifikasi di dermis, mengindikasikan fagositosis melanin berlebih. Selain itu, terdapat proliferasi serabut kolagen dengan susunan yang lebih rapat dibandingkan kelompok sehat. Temuan ini mengindikasikan adanya proses inflamasi dan remodeling jaringan sebagai respons terhadap stres oksidatif akibat paparan UVB. Kandungan melanin yang lebih tinggi secara signifikan pada kelompok B dibandingkan kelompok A memperkuat keberhasilan induksi hiperpigmentasi, sekaligus menunjukkan keparahan perubahan morfologi jaringan kulit pada tingkat mikroskopis.



Gambar 5.6 Gambaran Mikroskopis Jaringan Kulit Sehat (A) dan Jaringan Kulit Setelah dipapar UVB pada Mencit C57BL/6 (B)

Setelah mencit tervalidasi mengalami hiperpigmentasi, mencit tanpa

induksi UVB sebagai kontrol sehat (K1), mencit yang diberikan paparan UVB dan hiperpigmentasi dibagi menjadi 4 kelompok yaitu K2 diberi larutan NaCl 9%, K3 diberi 0,3 gram niacinamide dan alpha arbutin, K4 diberi injeksi EH-MSC dengan dosis 200 µl, dan K5 diberi injeksi EH-MSC dengan dosis 200 µl bersamaan dengan alpha arbutin dan niacinamide topikal.

Pemberian injeksi EH-MSCs dengan dosis 200 µl sebanyak dua kali, yaitu pada hari ke-1 dan ke-4 setelah mencit dipastikan mengalami hiperpigmentasi. Pada hari ketujuh setelah injeksi, sampel jaringan kulit dikumpulkan, dihomogenisasi menggunakan RIPA *buffer* yang dilengkapi *inhibitor protease* untuk mencegah degradasi protein, kemudian disentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan selanjutnya digunakan untuk menganalisis ekspresi MC1R dan TYRP1 melalui metode qRT-PCR.

5.1.3. Hasil Pemeriksaan Ekspresi MC1R

Pengukuran ekspresi MC1R menunjukkan bahwa rerata tertinggi ditemukan pada kelompok K2 (NaCl 0,9%) sebesar 2,275, diikuti kelompok K3 (alpha arbutin 5% dan niacinamid 4%) sebesar 2,000, K5 (EH- MSCs 200 µl, alpha arbutin 5%, niacinamid 4%) sebesar 1,157, K1 (kelompok sehat) sebesar 1,018, dan terendah ditemukan pada K4 (EH- MSCs 200 µl) sebesar 0,992. Hasil analisis rata-rata ekspresi MC1R pada setiap kelompok subyek penelitian ditunjukkan pada table 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.1. Ekspresi MC1R

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	<i>P value</i>
Ekspresi MC1R						
Mean	1,018	2,275	2,000	0,992	1,157	
SD	±0,021	±0,152	±0,155	±0,352	±0,172	
<i>Shapiro Wilk</i>	0,317	0,739	0,058	0,508	0,624	
<i>Levene Test</i>						0,035
<i>One way anova</i>						0,000
Keterangan:						
	<i>*Shapiro-Wilk</i>		= Normal ($p > 0,05$)			
	<i>*Leuvene Test</i>		= Tidak Homogen ($p < 0,05$)			
	<i>*Oneway ANOVA</i>		= Signifikan ($p < 0,05$)			

Analisis distribusi data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* mengungkapkan bahwa semua kelompok memiliki distribusi normal ($p > 0,05$), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.1. Uji *Levene* untuk homogenitas varians mengonfirmasi bahwa ada varians yang tidak homogen sebesar 0,035 ($p < 0,05$) pada data ekspresi MC1R di antara lima kelompok. Uji *One-Way ANOVA* dilakukan karena sifat data yang normal dan tidak homogen. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik ($p = 0,0000$, $p < 0,05$) di semua kelompok, menunjukkan bahwa perlakuan pada masing-masing kelompok secara signifikan mempengaruhi ekspresi MC1R.

Karena data normal dan tidak homogen, uji *Post Hoc Tamhane* digunakan untuk menganalisis hubungan antara kedua kelompok.

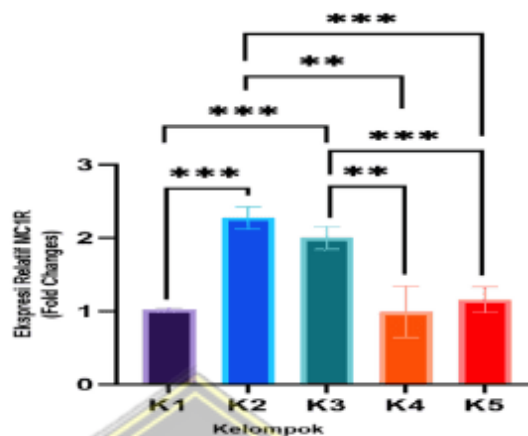
Tabel 5.2 Hasil Uji *Post Hoc Tamhane* MC1R

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,000*	0,000*	1,000	0,674
K2	-	-	0,108	0,001*	0,000*
K3	-	-	-	0,004*	0,000*
K4	-	-	-	-	0,983
K5	-	-	-	-	-

Keterangan :

* = berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 5.3 uji *Post Hoc Tamhane* mengungkapkan bahwa K1 berbeda signifikan dengan K2 dan K3 ($p < 0,05$), namun tidak dengan K4 dan K5. Hal ini menandakan bahwa perlakuan K2 (NaCl 0,9%) dan K3 (alpha arbutin 5% dan niacinamide 4%) mengalami peningkatan ekspresi MC1R dibanding kulit sehat, sedangkan perlakuan *exosome* tunggal maupun kombinasi (K4 dan K5) mampu menekan ekspresi MC1R hingga mendekati normal. K2 tidak berbeda dengan K3 ($p = 0,108$), menunjukkan efek K3 tidak lebih baik dari NaCl 0,9%. Sebaliknya, K2 dan K3 berbeda signifikan dengan K4 dan K5 ($p < 0,05$), yang berarti *exosome* tunggal maupun kombinasi lebih efektif menurunkan ekspresi MC1R. Perbandingan K4 dan K5 tidak berbeda bermakna ($p = 0,983$), sehingga efektivitas *exosome* tunggal setara dengan kombinasi *exosome*, alpha arbutin, 5% dan niacinamide 4%.



Gambar 5.7 Ekspresi Relatif Gen MC1R

Gambar 5.7 menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara K1 dengan K2, K3 dengan nilai rata-rata ekspresi relatif secara berurutan adalah 0,018, 2,275, 2,000. Terdapat perbedaan signifikan antara K2 dengan K4, K5 dengan nilai rata-rata ekspresi relatif secara berurutan Adalah 2,275, 0,991, 1,156. Dan terdapat perbedaan signifikan antara K3 dengan K4, K5 dengan nilai rata-rata ekspresi relatif secara berurutan Adalah 2,000, 0,991, 1,156.

5.1.4 Hasil Pemeriksaan Ekspresi TYRP1

Pengukuran ekspresi TYRP1 menunjukkan bahwa rerata tertinggi ditemukan pada kelompok K2 (NaCl 0,9%) sebesar 2,467, diikuti kelompok K3 (alpha arbutin 5% dan niacinamid 4%) sebesar 2,079, K1 (kelompok sehat) sebesar 1,017, K4 (EH- MSCs 200 µl) sebesar 0,910, dan terendah

pada K5 (EH- MSCs 200 μ l, alpha arbutin 5%, niacinamid 4%) sebesar 0,732. Hasil analisis rata-rata ekspresi TYRP1 pada setiap kelompok subyek penelitian ditunjukkan pada table 5.3 sebagai berikut:

Tabel 5.3 Ekspresi TYRP1

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	P value
Ekspresi TYRP1						
Mean	1,0167	2,467	2,079	0,910	0,732	
SD	$\pm 0,175$	$\pm 0,246$	$\pm 0,175$	$\pm 0,366$	$\pm 0,380$	
Shapiro Wilk	0,918	0,718	0,278	0,659	0,515	
Levene Test						0,056
One way anova						0,000
Keterangan: *Shapiro-Wilk = Normal ($p > 0,05$)						
*Leuvene Test = Homogen ($p > 0,05$)						
*Oneway Anova = Signifikan ($p < 0,05$)						

Distribusi data masing-masing kelompok adalah normal berdasarkan uji *Shapiro-Wilk* untuk kenormalan ($p > 0,05$). Uji *Levene* untuk homogenitas varians mengonfirmasi bahwa data ekspresi TYRP1 kelima kelompok memiliki varians yang homogen yaitu 0,056 ($p > 0,05$). Setelah itu uji *One-Way ANOVA* dijalankan. Terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik pada ekspresi TYRP1 antara kelompok perlakuan, yang ditunjukkan dengan nilai $p = 0,0000$ ($p < 0,05$).

Uji *Post Hoc LSD* digunakan untuk menilai hubungan antara kedua kelompok, karena data bersifat normal dan homogen.

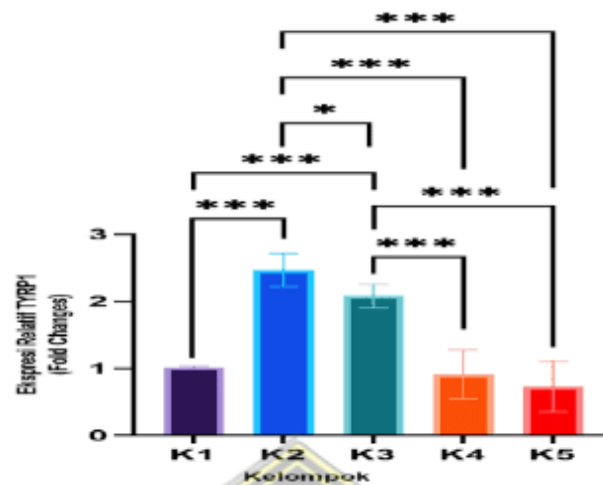
Tabel 5.4 Hasil Uji *Post Hoc* LSD TYRP1

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,000*	0,000*	0,504	0,082
K2	-	-	0,021*	0,000*	0,000*
K3	-	-	-	0,000*	0,000*
K4	-	-	-	-	0,268
K5	-	-	-	-	-

Keterangan :

* = berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Berdasarkan gambar 5.4 uji *Post Hoc* LSD menunjukkan bahwa ekspresi TYRP1 pada K1 berbeda signifikan dengan K2 dan K3 ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda signifikan dengan K4 dan K5. Hal ini memandakan bahwa ekspresi TYRP1 meningkat pada perlakuan K2 (NaCl 0,9%) maupun K3 (alpha arbutin 5% dan niacinamid 4%), sedangkan pada perlakuan K4 *exosome* tunggal maupun K5 kombinasi *exosome* dengan alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% mampu menekan ekspresi TYRP1 hingga mendekati kondisi sehat. K2 berbeda signifikan dengan semua kelompok ($p < 0,05$), menunjukkan semua perlakuan (K3, K4, dan K5) dapat menurunkan ekspresi TYRP1. Pada K3 berbeda signifikan dengan K4 dan K5 ($P < 0,05$), menunjukkan bahwa perlakuan *exosome* baik tunggal maupun kombinasi dengan alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% efektif menurunkan ekspresi TYRP1. Pada K4 dan K5 tidak menunjukkan perbedaan signifikan ($p > 0,05$) menunjukkan perlakuan *exosome* tunggal dalam menurunkan ekspresi TYRP1 relatif sama dengan perlakuan kombinasi *exosome*, alpha arbutine 5% dan niacinamide 4%.



Gambar 5.8 Ekspresi Relatif Gen TYRP1

Berdasarkan gambar 5.8 menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara K1 dengan K2, K3 dengan nilai rata-rata ekspresi relatif secara berurutan adalah 0,017, 2,467, 2,078. Terdapat perbedaan signifikan antara K2 dengan K3, K4, K5 dengan nilai rata-rata ekspresi relatif secara berurutan adalah 2,467, 2,078, 0,910, 0,731. Dan terdapat perbedaan signifikan antara K3 dengan K4, K5 dengan nilai rata-rata ekspresi relatif secara berurutan adalah 2,078, 0,910, 0,731.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa paparan sinar UVB pada dengan kekuatan 180 mJ/cm² selama 14 hari berhasil menginduksi hiperpigmentasi pada kulit mencit C57BL/6. Kondisi tersebut terlihat melalui pengamatan makroskopis secara visual dan secara mikroskopis melalui pewarnaan *Masson-Fontana*. Hal ini sesuai dengan teori bahwa radiasi UVB

adalah faktor lingkungan eksternal (eksogen) yang mampu menginduksi aktivasi proses melanogenesis yaitu sintesis pigmen melanin oleh sel melanosit.⁸

Reseptor MC1R memiliki peran penting dalam regulasi pigmentasi kulit. Reseptor ini diaktifkan oleh α -MSH hasil pemrosesan POMC maupun oleh ACTH, yang selanjutnya mengaktifkan jalur cAMP–PKA dan menstimulasi ekspresi MITF. MITF berperan sebagai regulator utama melanogenesis dengan mengatur transkripsi gen TYR, TYRP1, dan TYRP2 yang terlibat langsung dalam pembentukan melanin pada melanosit.^{1,44} Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan ekspresi MC1R dan TYRP1 setelah induksi UVB pada mencit, di mana kelompok kontrol negatif (K2) memperlihatkan ekspresi lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat (K1), sehingga sejalan dengan teori tersebut.

Mesenchymal stem cells (MSCs) yang dikultur dalam kondisi hipoksia (EH-MSCs) memiliki potensi terapeutik dalam modulasi pigmentasi kulit. Kondisi hipoksia terbukti meningkatkan sekresi *exosome* yang mengandung miRNA dan faktor pertumbuhan yang berperan menghambat melanogenesis.⁶⁴ *Exosome* mengandung berbagai komponen aktif, termasuk miRNA seperti miR-181a-5p dan miR-199a, yang dapat menekan ekspresi gen penting dalam jalur melanogenesis, termasuk MITF, TYR, dan TYRP1, sehingga sintesis melanin berkurang.²¹ Selain itu, *exosome* juga berfungsi sebagai mediator komunikasi antara keratinosit dan melanosit, serta berperan dalam transportasi melanosom dengan memengaruhi kelangsungan hidup

melanosit dan mengatur ekspresi protein enzimatis seperti TYR, TYRP1, TYRP2, dan MITF.⁶¹ Alpha arbutin sebagai derivat hidrokuinon menghambat enzim tirosinase dan dilaporkan dapat menekan ekspresi MC1R melalui downregulasi MITF.^{17,65} Sementara itu, niacinamide berperan menghambat transfer melanosom ke keratinosit serta menekan jalur inflamasi yang dapat merangsang MC1R.^{18,67}

Pemberian EH-MSCs 200 µl, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh terhadap ekspresi MC1R dan TYRP1. Hasil analisis menunjukkan bahwa ekspresi MC1R mengalami penurunan signifikan pada kelompok pemberian EH-MSCs 200 µl dan kelompok pemberian kombinasi EH-MSCs 200 µl, alpha arbutin 5%, niacinamide 4%) dibandingkan kelompok yang diberi NaCl 0,9% dan kelompok yang diberi alpha arbutin 5% dan niacinamid 4%. Namun perbandingan antara kelompok yang diberikan EH-MSCs 200 µl tunggal tidak menunjukkan perberbedaan bermakna secara statistik dengan kelompok kombinasi EH-MSCs 200 µl, alpha arbutin, 5% dan niacinamide 4%). Sehingga dapat disimpulkan bahwa efektivitas EH-MSCs 200 µl tunggal sebanding dengan kombinasi EH-MSCs 200 µl, alpha arbutin, 5% dan niacinamide 4% dalam menurunkan ekspresi MC1R. Penurunan MC1R terjadi karena MC1R berperan penting dalam mengaktivasi jalur pensinyalan cAMP/PKA/CREB, yang kemudian meningkatkan transkripsi gen melanogenik, termasuk MITF. MITF merupakan faktor transkripsi utama yang mengatur

ekspresi enzim tirosinase dan protein TYRP1 dan TYRP2. Oleh karena itu, inhibisi ekspresi MC1R akan menekan aktivasi jalur tersebut, sehingga transkripsi gen melanogenik berkurang dan produksi melanin menurun.^{2-4,45}

Pada analisis ekspresi TYRP1 hasil penelitian ini menunjukkan penurunan signifikan pada kelompok perlakuan dengan EH-MSCs 200µl tunggal maupun kombinasi EH-MSCs 200 µl, alpha arbutin, 5% dan niacinamide 4%, jika dibandingkan dengan kelompok yang diberi NaCl 0,9% dan kelompok yang diberi alpha arbutin 5% dan niacinamid 4%. Pada pemberian kombinasi EH-MSCs 200 µl menunjukkan penurunan ekspresi TYRP1 lebih rendah dibandingkan pemberian EH-MSCs 200 µl tunggal. Namun perbandingan antara kelompok yang diberikan EH-MSCs 200 µl tunggal tidak menunjukkan perberbedaan bermakna secara statistik dengan kelompok kombinasi EH-MSCs 200 µl, alpha arbutin, 5% dan niacinamide 4%. TYRP1 berperan dalam menjaga stabilitas enzim tirosinase serta turut berkontribusi pada fase akhir biosintesis *eumelanin* melalui proses oksidasi DHICA. Penurunan ekspresi TYRP1 mengindikasikan adanya hambatan langsung pada tahap akhir melanogenesis, sehingga produksi melanin dapat berkurang secara lebih efektif. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa *exosome* dari EH-MSCs, melalui kandungan bioaktif berupa miRNA seperti miR-181a-5p dan miR-199a, mampu menekan ekspresi TYRP1 dengan cara menginhibisi MITF sekaligus mengaktivasi mekanisme *autophagy*. Efek penghambatan tersebut diperkuat oleh alpha arbutin yang bekerja sebagai inhibitor enzim tirosinase, serta niacinamide yang memiliki

sifat antiinflamasi dan protektif terhadap kerusakan DNA akibat paparan sinar UV.^{1,21,52,53}

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian EH-MSCs 200 µl, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi mampu menurunkan ekspresi MC1R dan TYRP1 secara signifikan. Penurunan ekspresi tersebut menandakan bahwa perlakuan kombinasi efektif dalam menghambat aktivasi jalur melanogenesis terutama pada tingkat reseptor. Adanya titik kerja yang saling melengkapi antara ketiga agen ini memperkuat potensi kombinasi EH-MSCs, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% sebagai terapi depigmentasi berbasis sel punca yang tidak hanya efektif, tetapi juga aman dan multifungsional.

Penelitian ini memiliki keterbatasan, pertama tahap uji yang digunakan pada penelitian dengan mencit C57BL/6 hasilnya belum sepenuhnya dapat diaplikasikan pada manusia dan memerlukan penelitian lanjutan berupa uji preklinik. Keterbatasan kedua tidak dilakukan validasi miR-181a-5 dan miR-199a pada *exosome* yang digunakan dalam perlakuan, sehingga mekanisme molekuler yang berperan dalam proses melanogenesis belum sepenuhnya terkonfirmasi. Keterbatasan ketiga jumlah sampel penelitian relatif kecil, yang dapat memengaruhi kekuatan analisis statistik. Keterbatasan keempat evaluasi ekspresi protein hanya terbatas pada qRT-PCR tanpa dilengkapi metode imunohistokimia maupun western blot yang sebenarnya dapat memberikan gambaran lebih komprehensif mengenai

ekspresi protein target. Penelitian lanjutan dengan desain yang lebih lengkap dan jumlah sampel lebih besar sangat diperlukan untuk memperkuat temuan ini.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

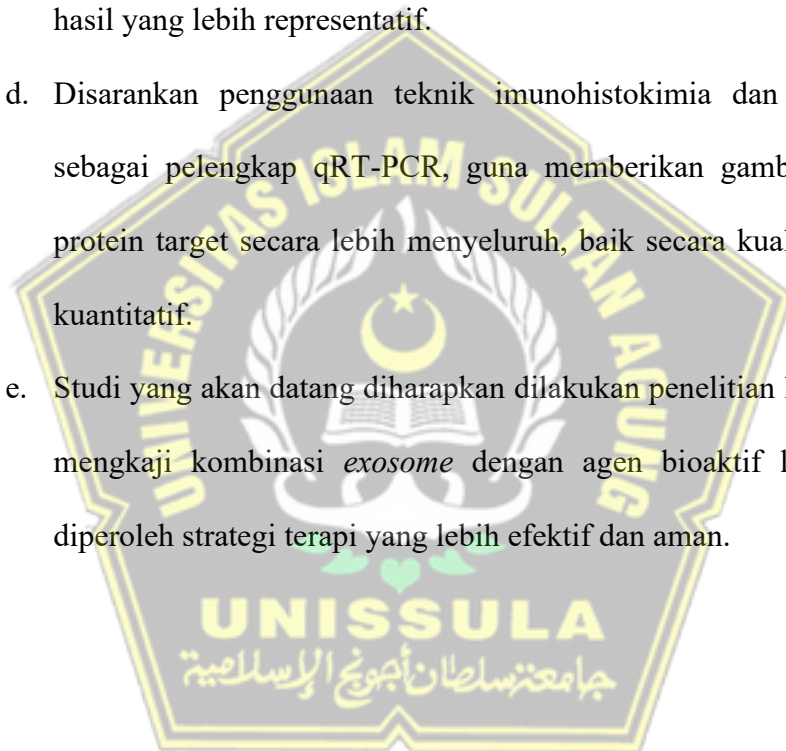
Hasil penelitian pengaruh pemberian injeksi EH-MSC dosis 200 μ l, topikal alpha arbutin 5% dan niacinamide 4% masing-masing 0,3 gram pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi terhadap penurunan ekspresi MC1R dan TYRP1 menunjukkan hal-hal berikut:

- a. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome hypoxia mesenchymal stem cell* (EH-MSC) 200 μ l, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% terhadap penurunan ekspresi MC1R pada mencit CL7BL/6 model hiperpigmentasi dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- b. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome hypoxia mesenchymal stem cell* (EH-MSC) 200 μ l, alpha arbutin 5%, dan niacinamide 4% terhadap penurunan ekspresi TYRP1 pada mencit CL7BL/6 model hiperpigmentasi dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

- a. Penelitian lanjutan perlu dilakukan pada uji preklinik untuk memastikan efektivitas dan keamanan jangka panjang dari kombinasi EH-MSCs dengan alpha arbutin 5% dan niacinamid 4% untuk kemungkinan diaplikasikan pada manusia dalam menangani hiperpigmentasi, sehingga hasil dapat lebih aplikatif pada praktik klinis.

- b. Diperlukan analisis dan validasi lebih lanjut terhadap peran miR-181a-5 dan miR-199a pada *exosome* yang digunakan, agar mekanisme molekuler yang mendasari efek terapi dapat dijelaskan secara lebih akurat.
- c. Jumlah sampel perlu diperbanyak pada penelitian berikutnya untuk meningkatkan kekuatan uji statistik, mengurangi bias, serta memperoleh hasil yang lebih representatif.
- d. Disarankan penggunaan teknik imunohistokimia dan *western blot* sebagai pelengkap qRT-PCR, guna memberikan gambaran ekspresi protein target secara lebih menyeluruh, baik secara kualitatif maupun kuantitatif.
- e. Studi yang akan datang diharapkan dilakukan penelitian lanjutan untuk mengkaji kombinasi *exosome* dengan agen bioaktif lain, sehingga diperoleh strategi terapi yang lebih efektif dan aman.



DAFTAR PUSTAKA

1. Jia X, Ding P, Chen S, Zhao S, Wang J, Lai S. Analysis of mc1r, mitf, tyr, tyrp1, and mlph genes polymorphism in four rabbit breeds with different coat colors. *Animals*. 2021;11(1):1-10. doi:10.3390/ani11010081
2. D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7). doi:10.3390/ijms17071144
3. 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
4. Nasti TH, Timares L. MC1R, eumelanin and pheomelanin: Their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2015;91(1):188-200. doi:10.1111/php.12335
5. Barrell A. Clinical Practice Insights for Hyperpigmentation Treatment. *European Medical Journal*. Published online September 12, 2024;30-38. doi:10.33590/emj/PCMJ2598
6. Bidang Ilmu Kesehatan J, Sulistiyowati A, Pendidikan Fisika S. *Potensi Keberagaman SPF (Sun Protection Factor) Sunscreen Terhadap Perlindungan Paparan Sinar Ultraviolet Berdasarkan Iklim Di Indonesia*. <http://ejournal.urindo.ac.id/index.php/kesehatan>
7. Meyer P, Van de Poel B, De Coninck B. UV-B light and its application potential to reduce disease and pest incidence in crops. *Hortic Res*. 2021;8(1). doi:10.1038/s41438-021-00629-5
8. Yang CY, Guo Y, Wu WJ, Man MQ, Tu Y, He L. UVB-Induced Secretion of IL-1 β Promotes Melanogenesis by Upregulating TYR/TRP-1 Expression In Vitro. *Biomed Res Int*. 2022;2022. doi:10.1155/2022/8230646
9. Publishing Inc B, Taylor A, Pawaskar M, Taylor SL, Balkrishnan R, Feldman SR. *Cosmetic Commentary Prevalence of Pigmentary Disorders and Their Impact on Quality of Life: A Prospective Cohort Study*. Vol 7.; 2008.
10. Putri Brilliant Betrasta Viorizka, Trisniartami Setyaningrum, Ema Qurnianingsih, Damayanti. The Profile and Triggering Factors of Melasma Patients: A Retrospective Study. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin*. 2023;35(2):142-147. doi:10.20473/bikk.v35.2.2023.142-147

11. Sarkar R, Arora P, Garg Kv. Cosmeceuticals for hyperpigmentation: What is available? *J Cutan Aesthet Surg*. 2013;6(1):4. doi:10.4103/0974-2077.110089
12. Fedorchenko Y. Pathophysiological Insights Into Facial Hyperpigmentation And Aesthetic Treatment Modalities. *Anti-Aging Eastern Europe*. 2025;4(1):14-19. doi:10.56543/aaeeu.2025.4.1.02
13. Draelos ZD. The Art and Science of New Advances in Cosmeceuticals. *Clin Plast Surg*. 2011;38(3):397-407. doi:10.1016/j.cps.2011.02.002
14. Boo YC. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties. *Antioxidants*. 2021;10(7). doi:10.3390/antiox10071129
15. Maldonado López A, da Silva Souza I. Facial Toner Containing 2% Arbutin and 3% Niacinamide Improves Pore Appearance, Uneven Skin Texture, and Skin Brightness Measured by Individual Typology Angle. Published online April 2, 2025. doi:10.20944/preprints202504.0168.v1
16. Boo YC. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties. *Antioxidants*. 2021;10(7). doi:10.3390/antiox10071129
17. Tantanasrigul P, Sripha A, Chongmelaxme B. The Efficacy of Topical Cosmetic Containing Alpha-Arbutin 5% and Kojic Acid 2% Compared With Triple Combination Cream for the Treatment of Melasma: A Split-Face, Evaluator-Blinded Randomized Pilot Study. *J Cosmet Dermatol*. Published online January 1, 2024. doi:10.1111/jocd.16562
18. Berson DS, Osborne R, Oblong JE, Hakoziaki T, Johnson MB, Bissett DL. *Niacinamide: A Topical Vitamin with Wide-Ranging Skin Appearance Benefits.*; 2014.
19. Castanedo-Cazares JP, Lárraga-Piñones G, Ehnis-Pérez A, et al. Topical niacinamide 4% and desonide 0.05% for treatment of axillary hyperpigmentation: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2013;6:29-36. doi:10.2147/ccid.s39246
20. Zheng J, Yang B, Liu S, Xu Z, Ding Z, Mo M. Applications of Exosomal miRNAs from Mesenchymal Stem Cells as Skin Boosters. *Biomolecules*. 2024;14(4). doi:10.3390/biom14040459
21. Wang XY, Guan XH, Yu ZP, et al. Human amniotic stem cells-derived exosomal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote

- melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-021-02570-9
22. Oleh D, Salma :, Azzahara Y. *Pengaruh Pemberian Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell Terhadap Ekspresi Mip-1α Dan Cd68 (Studi Eksperimental in Vivo Pada Mencit C57BL Hiperpigmentasi Yang Diinduksi Sinar UVB).*
 23. Wang T. Stem cell-derived exosomes in the treatment of melasma and its percutaneous penetration. Published online 2023.
 24. Zha J, Pan Y, Liu X, Zhu H, Liu Y, Zeng W. Exosomes from hypoxia-pretreated adipose-derived stem cells attenuate ultraviolet light-induced skin injury via delivery of circ-Ash11. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2023;39(2):107-115. doi:10.1111/phpp.12857
 25. Yang Y, Wei X, Bai J, et al. MicroRNA-340 is involved in ultraviolet B-induced pigmentation by regulating the MITF/TYRP1 axis. *Journal of International Medical Research.* 2020;48(11). doi:10.1177/0300060520971510
 26. Megawati Agustina C, Setiawan E, Putra A. MSC-Exosomes Hypoxia (EH- MSCs) in modulating Apaf-1 and Survivin in UVB-induced skin aging. Published online 2025. doi:10.29238/teknolabjournal.v14i1.541
 27. Fu Y, Xie J ling, Zhang W ting, et al. Synergistic delivery of hADSC-Exos and antioxidants has inhibitory effects on UVB-induced skin photoaging. *Heliyon.* 2024;10(15). doi:10.1016/j.heliyon.2024.e34321
 28. Thawabteh AM, Jibreen A, Karaman D, Thawabteh A, Karaman R. Skin Pigmentation Types, Causes and Treatment—A Review. *Molecules.* 2023;28(12). doi:10.3390/molecules28124839
 29. Serre C, Busuttil V, Botto JM. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. *Int J Cosmet Sci.* 2018;40(4):328-347. doi:10.1111/ics.12466
 30. Choi W, Miyamura Y, Wolber R, et al. Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure: Molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. *Journal of Investigative Dermatology.* 2010;130(6):1685-1696. doi:10.1038/jid.2010.5
 31. Peixoto R, Fonseca P. Hyperpigmentation Associated With Hormonal Contraceptive Use. *Open Access Journal International Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences.* 2019;6(3). doi:10.5281/zenodo.2616927

32. Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet.* 2009;18(R1). doi:10.1093/hmg/ddp003
33. Donida L, Miot B, Miot HA, Guimarães Da Silva M, Esther M, Marques A. *Fisiopatologia Do Melasma * Physiopathology of Melasma.* Vol 84.; 2009.
34. 483-Article Text-972-1-10-20161222.
35. Guinot C, Cheffai S, Latreille J, et al. Aggravating factors for melasma: A prospective study in 197 Tunisian patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2010;24(9):1060-1069. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03592.x
36. Chaowattanapanit S, Silpa-archa N, Kohli I, Lim HW, Hamzavi I. Postinflammatory hyperpigmentation: A comprehensive overview: Treatment options and prevention. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77(4):607-621. doi:10.1016/j.jaad.2017.01.036
37. Giménez García RM, Molina SC. Drug-induced hyperpigmentation: Review and case series. *Journal of the American Board of Family Medicine.* 2019;32(4):628-638. doi:10.3122/jabfm.2019.04.180212
38. d'Ischia M, Wakamatsu K, Cicoira F, et al. Melanins and melanogenesis: From pigment cells to human health and technological applications. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(5):520-544. doi:10.1111/pcmr.12393
39. Seiberg M. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* 2001;14(4):236-242. doi:10.1034/j.1600-0749.2001.140402.x
40. Guo L, Li W, Gu Z, et al. Recent Advances and Progress on Melanin: From Source to Application. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5). doi:10.3390/ijms24054360
41. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):4066-4087. doi:10.3390/ijms10094066
42. Nautiyal A, Wairkar S. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2021;34(6):1000-1014. doi:10.1111/pcmr.12986
43. Maddaleno AS, Camargo J, Mitjans M, Vinardell MP. cosmetics Melanogenesis and Melasma Treatment. Published online 2021. doi:10.3390/cosmetics

44. Does RM, Liang L, Davis P, Thomas AL, Petko B. Melanocortin receptors: Evolution of ligand selectivity for melanocortin peptides. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(4):T119-T133. doi:10.1530/JME-15-0292
45. Guida S, Guida G, Goding CR. MC1R Functions, Expression, and Implications for Targeted Therapy. *Journal of Investigative Dermatology*. 2022;142(2):293-302.e1. doi:10.1016/j.jid.2021.06.018
46. Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry - A European Journal*. 2018;24(1):47-55. doi:10.1002/chem.201704410
47. Wolf Horrell EM, Boulanger MC, D'Orazio JA. Melanocortin 1 receptor: Structure, function, and regulation. *Front Genet*. 2016;7(MAY). doi:10.3389/fgene.2016.00095
48. Mun YW, Kim WH, Shin D. Melanocortin 1 Receptor (MC1R): Potentials as Therapeutic Targets. Published online May 23, 2023. doi:10.20944/preprints202305.1558.v1
49. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007;445(7130):843-850. doi:10.1038/nature05660
50. Manganelli M, Guida S, Ferretta A, et al. Behind the scene: Exploiting mc1r in skin cancer risk and prevention. *Genes (Basel)*. 2021;12(7). doi:10.3390/genes12071093
51. Yang Y, Wei X, Bai J, et al. MicroRNA-340 is involved in ultraviolet B-induced pigmentation by regulating the MITF/TYRP1 axis. *Journal of International Medical Research*. 2020;48(11). doi:10.1177/0300060520971510
52. Alaluf S, Barrett K, Blount M, Carter N. *Ethnic Variation in Tyrosinase and TYRP1 Expression in Photoexposed and Photoprotected Human Skin*.
53. Gautron A, Migault M, Bachelot L, Corre S, Galibert MD, Gilot D. Human TYRP1: Two functions for a single gene? *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021;34(5):836-852. doi:10.1111/pcmr.12951
54. Saternus R, Pilz S, Gräber S, et al. A closer look at evolution: Variants (SNPs) of genes involved in skin pigmentation, including exoc2, tyr, tyrp1, and dct, are associated with 25(oh)d serum concentration. *Endocrinology*. 2015;156(1):39-47. doi:10.1210/en.2014-1238
55. 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
56. Casado-Díaz A, Quesada-Gómez JM, Dorado G. Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8. doi:10.3389/fbioe.2020.00146
 57. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell.* 2019;177(2):428-445.e18. doi:10.1016/j.cell.2019.02.029
 58. Zhao W, Li K, Li L, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as Drug Delivery Vehicles in Disease Therapy. *Int J Mol Sci.* 2024;25(14). doi:10.3390/ijms25147715
 59. Dal’Forno-Dini T, Birck MS, Rocha M, Bagatin E. Exploring the reality of exosomes in dermatology. *An Bras Dermatol.* Published online January 1, 2024. doi:10.1016/j.abd.2024.09.002
 60. Ha DH, Kim HK, Lee J, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration. *Cells.* 2020;9(5). doi:10.3390/cells9051157
 61. Cicero A Lo, Delevoye C, Gilles-Marsens F, et al. Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation. *Nat Commun.* 2015;6. doi:10.1038/ncomms8506
 62. Zhuo H, Chen Y, Zhao G. Advances in application of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12. doi:10.3389/fcell.2024.1446050
 63. Yusoff FM, Nakashima A, Kawano KI, et al. Implantation of Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell Advances Therapeutic Angiogenesis. *Stem Cells Int.* 2022;2022. doi:10.1155/2022/6795274
 64. Ye Y, Zhao X, Xu Y, Yu J. Hypoxia-Inducible Non-coding RNAs in Mesenchymal Stem Cell Fate and Regeneration. *Frontiers in Dental Medicine.* 2021;2. doi:10.3389/fdmed.2021.799716
 65. 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

66. Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K, Kuriki T. *Inhibitory Effects of a A-Arbutin on Melanin Synthesis in Cultured Human Melanoma Cells and a Three-Dimensional Human Skin Model*. Vol 27.; 2004.
67. Wohlrab J, Kreft D. Niacinamide-mechanisms of action and its topical use in dermatology. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27(6):311-315. doi:10.1159/000359974
68. Bissett DL, Miyamoto K, Sun P, Li J, Berge CA. *Topical Niacinamide Reduces Yellowing, Wrinkling, Red Blotchiness, and Hyperpigmented Spots in Aging Facial Skin I*.
69. Castanedo-Cazares JP, Lárraga-Piñones G, Ehnis-Pérez A, et al. Topical niacinamide 4% and desonide 0.05% for treatment of axillary hyperpigmentation: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2013;6:29-36. doi:10.2147/ccid.s39246
70. Fu C, Chen J, Lu J, et al. Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol Med Rep*. 2020;21(3):1421-1430. doi:10.3892/mmr.2020.10950
71. Boo YC. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties. *Antioxidants*. 2021;10(7). doi:10.3390/antiox10071129
72. Peixoto R, Fonseca P. Hyperpigmentation Associated With Hormonal Contraceptive Use. *Open Access Journal International Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences*. 2019;6(3). doi:10.5281/zenodo.2616927