

**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEMCELL DAN *HYALURONIC*
ACID TERHADAP EKSPRESI GEN TNF- α DAN p21
(Studi Eksperimental pada Tikus Galur Wistar Model *Collagen*
Loss Akibat Paparan UVB)**

Tesis

untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister Ilmu Biomedik



Magister Ilmu Biomedik

Lis Julianti

MBK 24.24.010512

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2026**

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEMCELL* DAN *HYALURONIC ACID* TERHADAP EKSPRESI GEN

TNF- α DAN P21

(Studi Eksperimental pada Tikus Galur Wistar Model *Collagen Loss* Akibat Paparan UVB)

Disusun oleh:

Lis Julianti

MBK 24.24.010512

akan dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal Februari 2026
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I

Pembimbing II

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

Dr. Suparmi, S.Si., M.Si (ERT)
NIK. 210109126

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung








Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes
NIK. 210 198 046

LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI

Laporan Tesis Dengan Judul “PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEMCELL* DAN *HYALURONIC ACID* TERHADAP EKSPRESI GEN TNF- α DAN p21 (Studi Eksperimental pada Tikus Galur Wistar Model *Collagen Loss* Akibat Paparan UVB)” ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada :

Hari : Kamis

Tanggal : 12 Februari 2026

NO	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1.	Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek sumarawati, M.Kes	Penguji I	
2.	Dr. dr.H.Hadi Sarosa,M.Kes	Penguji II	
3.	Prof. Dr Siti Thomas Zulaikkah, SKM. Mkes	Penguji III	
4.	Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS	Pembimbing I	
5.	Dr.Suparmi, S.Si. Msi (ERT)	Pembimbing II	

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya 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, 20 Januari 2026
Yang menyatakan,



Lis Julianti
MBK 24.24.010512

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Lis Julianti
Tempat, tanggal lahir : Pontianak, 15 Juli 1986
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Kartika Pontianak : Lulus tahun 1992
2. SDN 25 Pontianak : Lulus tahun 1998
3. SMPN 7 Pontianak : Lulus tahun 2001
4. SMAN 3 Pontianak : Lulus tahun 2004
5. S1 Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia : Lulus tahun 2010
6. Profesi Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia : Lulus tahun 2012
7. Magister S2 Ilmu Biomedik UNISSULA Semarang (2024 – sekarang)

C. Riwayat Keluarga

Nama Ayah : Sopian Bakri
Nama Ibu : Nuriana
Nama Suami : Chalid Firdaus
Nama Anak :
1. Hafidz Pradipta Firdaus
2. Muhammad Azka Firdaus

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul “**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEMCELL* DAN *HYALURONIC ACID* TERHADAP EKSPRESI GEN TNF- α DAN P21 (Studi Eksperimental pada Tikus Galur Wistar Model *Collagen Loss* Akibat Paparan UVB)**”.

Tesis ini ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Tesis ini dapat tersusun dan terselesaikan karena adanya bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih khususnya kepada

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH.,M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para Wakil Rektor yang telah memberikan kesempatan kepadaya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B.FINACS selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dosen pembimbing I yang telah memberikan banyak masukan kepada penulis.
3. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang .
4. Dr. Suparmi, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah banyak

memberikan masukan dan membantu penulis dalam penyelesaian tesis ini.

5. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Suamarawati, M. Kes selaku dosen penguji I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. Dr. dr. H. Hadi Sarosa, M.Kes selaku dosen penguji II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
7. Prof. Dr Siti Thomas Zulaikkah, SKM. Mkes selaku dosen penguji III dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
8. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, 20 Januari 2026
Penulis,

Lis Julianti

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI	iii
PERNYATAAN.....	iv
RIWAYAT HIDUP.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
ABSTRAK	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Kolagen	8
2.1.1. Definisi Kolagen dan Tipe Kolagen.....	8
2.1.2. Sintesis dan Degradasi Kolagen.....	9
2.1.3. Peran Kolagen dalam Integritas Jaringan dan <i>Remodeling</i> Kulit yang Rusak	10

2.1.4.	Efek <i>Photoaging</i> terhadap <i>Collagen Loss</i>	11
2.2.	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> (TNF- α).....	12
2.2.1.	Definisi dan Struktur TNF- α	12
2.2.2.	Fungsi TNF- α	14
2.2.3.	Jalur Reseptor TNF- α	14
2.2.4.	Jalur Inflamasi pada <i>Photoaging</i> dan Peran TNF- α	16
2.3.	Gen p21 (CDKN1A).....	16
2.3.1.	Definisi dan Peran Gen p21.....	16
2.3.2.	Regulasi Ekspresi Gen p21.....	17
2.3.3.	Fungsi p21 dalam Siklus Sel dan Penuaan Seluler.....	18
2.3.4.	Penuaan Seluler pada <i>Photoaging</i> dan Peran Gen p21.....	19
2.4.	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC) dan <i>Exosome</i>	21
2.4.1.	Definisi dan Karakteristik <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSC).....	21
2.4.2.	Definisi, Biogenesis, dan Komposisi <i>Exosome</i> MSC.....	21
2.4.3.	Peran <i>Exosome</i> MSC dalam Regenerasi dan Sintesis Kolagen Kulit.....	22
2.4.4.	Pengaruh Kultur Hipoksia terhadap Potensi Terapeutik <i>Exosome</i> MSCs.....	23
2.5.	<i>Hyaluronic Acid</i>	24
2.5.1.	Definisi, Struktur, dan Sifat Fisikokimia.....	24
2.5.2.	Peran Fisiologis <i>Hyaluronic Acid</i> di Kulit.....	24
2.5.3.	Penggunaan <i>Hyaluronic Acid</i> sebagai Agen Terapeutik.....	25
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....		26
3.1.	Kerangka Teori.....	26
3.2.	Kerangka Konsep.....	29
3.3.	Hipotesis.....	29
BAB IV METODE PENELITIAN.....		30
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	30
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	31
4.2.1.	Variabel Penelitian.....	31
4.2.2.	Definisi Operasional.....	31

4.3.	Populasi dan Sampel Penelitian.....	33
4.3.1.	Subjek Penelitian.....	33
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	34
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	34
4.3.4.	Besar Sampel.....	35
4.4.	Alat dan Bahan.....	35
4.4.1.	Alat.....	35
4.4.2.	Bahan	36
4.5.	Cara Penelitian	36
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	36
4.5.2.	Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	36
4.5.3.	Pengambilan Sampel jaringan.....	37
4.5.4.	Validasi Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B.....	37
4.5.5.	Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen TNF- α dan P21 dengan qRT-PCR	38
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian	39
4.7.	Analisis Data.....	39
4.8.	Alur Penelitian	40
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		41
5.1.	Hasil Penelitian.....	41
5.1.1.	Hasil Validasi <i>Exosome MSCs hypoxia</i>	41
5.1.2.	Hasil Validasi <i>Collagen Loss</i> Pada Tikus yang Dipapar UVB ...	42
5.1.3.	Efek Pemberian <i>Exosome MSC hypoxia</i> dan <i>Hyaluronic Acid</i> Terhadap ekspresi gen TNF- α	44
5.1.4.	Efek Pemberian <i>Exosome MSC hypoxia</i> dan <i>Hyaluronic Acid</i> Terhadap ekspresi gen P21	46
5.2.	Pembahasan.....	49
5.3.	Keterbatasan penelitian.....	53

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	54
6.1. Kesimpulan	54
6.2. Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN.....	65



DAFTAR SINGKATAN

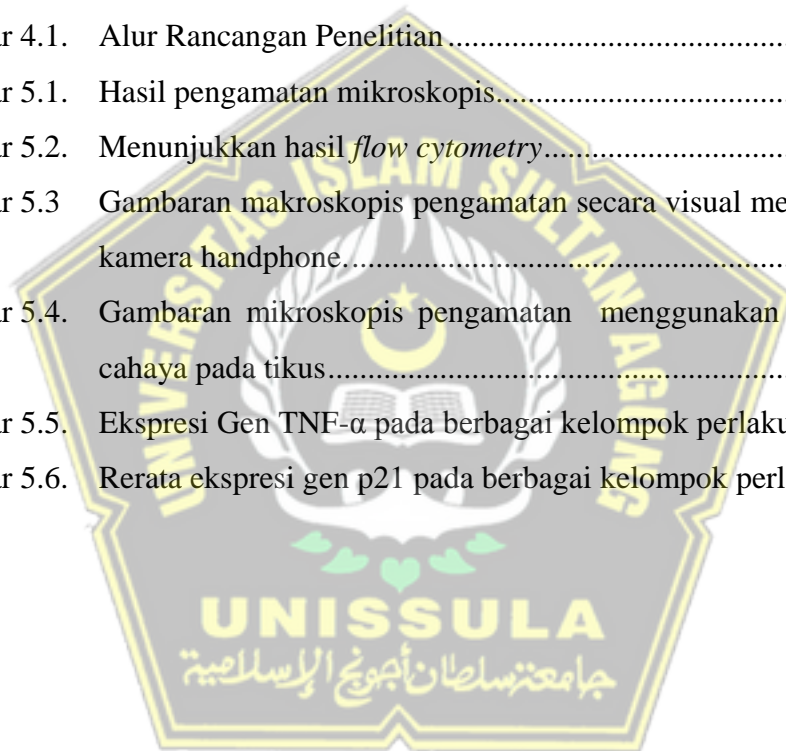
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
CDKN1A	: <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (gen p21)</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GAG	: <i>Glycosaminoglycan</i>
GAPDH	: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
HA	: <i>Hyaluronic Acid</i>
HIF-1 α	: <i>Hipoxic Induce Factor 1-alpha</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
ISCT	: <i>International Society for Cellular Therapy</i>
MAPK	: <i>Mitogen-actived Protein Kinases</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MSC-Exos	: <i>Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
p21	: <i>Tumor Protein p21</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
qRT-PCR	: <i>quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction</i>
SASP	: <i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SCCR	: <i>Stem Cell Cancer Reasearch</i>
TEWL	: <i>Transepidermal Water Loss</i>

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*
TNFR : *Tumor Necrosis Factor Receptor*
UVB : *Ultra Violet B*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*



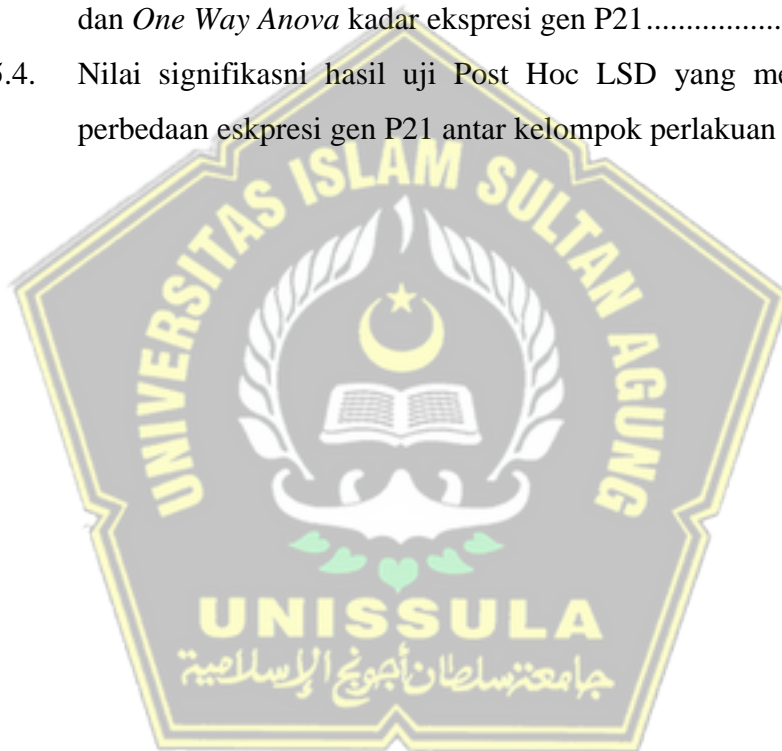
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	<i>Patogenesis</i> Photoaging.....	12
Gambar 2.2.	Kriteria minimum ISCT untuk mengidentifikasi Sel Punca Mesenkimal manusia.....	21
Gambar 2.3.	Struktur Kimia <i>Hyaluronic Acid</i>	24
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	28
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	29
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian.....	30
Gambar 5.1.	Hasil pengamatan mikroskopis.....	42
Gambar 5.2.	Menunjukkan hasil <i>flow cytometry</i>	42
Gambar 5.3	Gambaran makroskopis pengamatan secara visual menggunakan kamera handphone.....	43
Gambar 5.4.	Gambaran mikroskopis pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pada tikus.....	44
Gambar 5.5.	Ekspresi Gen TNF- α pada berbagai kelompok perlakuan.....	46
Gambar 5.6.	Rerata ekspresi gen p21 pada berbagai kelompok perlakuan.....	48



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5.1.	Rerata serta nilai signifikanasi dari Uji Normalitas, Homogenitas dan <i>One Way Anova</i> kadar ekspresi gen TNF- α	45
Tabel 5.2.	Nilai signifikanasi hasil uji Mann Whitney yang menunjukkan perbedaan ekspresi gen TNF- α antar kelompok perlakuan	46
Tabel 5.3.	Rerata serta nilai signifikanasi dari Uji Normalitas, Homogenitas dan <i>One Way Anova</i> kadar ekspresi gen P21.....	48
Tabel 5.4.	Nilai signifikanasi hasil uji Post Hoc LSD yang menunjukkan perbedaan ekspresi gen P21 antar kelompok perlakuan	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Permohonan Izin Penelitian	65
Lampiran 2.	Izin Etik Penelitian	66
Lampiran 3.	Surat Keterangan Hewan	67
Lampiran 4.	Hasil Penelitian.....	68
Lampiran 5.	Dokumentasi Penelitian.....	71
Lampiran 6.	Lampiran pengolahan data dengan SPSS	73



ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan Ultraviolet B (UVB) memicu kehilangan kolagen dan *photoaging* melalui peningkatan ekspresi gen pro-inflamasi dan gen yang berhubungan dengan *senescent* seperti *tumour necrosis factor-alpha* (TNF- α) dan p21 pada kulit. *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) dan *Hyaluronic Acid* (HA) dipertimbangkan sebagai terapi potensial untuk mengatasi kondisi tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen TNF- α dan p21 pada kulit tikus Wistar yang terpapar sinar UVB.

Metode: Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan desain *post-test only control group* menggunakan subjek tikus Wistar yang mengalami kehilangan kolagen akibat induksi UVB. Hewan coba dibagi secara acak ke dalam lima kelompok: kontrol sehat, kelompok UVB tanpa terapi (UVB+NaCl), kelompok UVB+HA, kelompok UVB+EH-MSCs, dan kelompok UVB+EH-MSCs+HA. Ekspresi gen TNF- α dan p21 pada jaringan kulit diukur menggunakan metode qRT-PCR.

Hasil: Ekspresi gen TNF- α dengan uji *Kruskal Wallis* (mean \pm SD 0.195 \pm 0.455) dan p21 dengan uji *One Way Anova* (mean \pm SD 0.380 \pm 0.817) pada paparan UVB terbukti lebih tinggi dibandingkan dengan kulit sehat. Ekspresi gen TNF- α dan p21 pada penggunaan EH-MSCs atau HA secara mandiri lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol UVB. Namun, kombinasi keduanya menunjukkan ekspresi gen TNF- α (mean \pm SD 0.068 \pm 0.116) dan p21 (mean \pm SD 0.191 \pm 0.306) yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Pemberian kombinasi EH-MSC dan HA menunjukkan adanya pengaruh terhadap tingkat ekspresi gen TNF- α dan p21 pada tikus jantan galur Wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

Kata Kunci: EH-MSC, HA, kehilangan kolagen, p21, radiasi UVB, TNF- α .

ABSTRACT

Background: Ultraviolet B (UVB) exposure triggers collagen loss and photoaging by increasing the expression of pro-inflammatory and senescence-related genes, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and p21, in the skin. Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell (EH-MSCs) and Hyaluronic Acid (HA) are considered potential therapies to address these conditions. This study aims to evaluate the effect of the combination of EH-MSCs and HA on the expression of TNF- α and p21 genes in the skin of Wistar rats exposed to UVB radiation.

Methods: This is an experimental study using a post-test only control group design on Wistar rat subjects experiencing UVB-induced collagen loss. The subjects were randomly divided into five groups: healthy control, UVB without therapy (UVB+NaCl), UVB+HA, UVB+EH-MSCs, and UVB+EH-MSCs+HA. The expression of TNF- α and p21 genes in the skin tissue was measured using the qRT-PCR method.

Results The expression of TNF- α with Kruskal Wallis Test (mean \pm SD 0.195 \pm 0.455) and p21 with One Way Anova Test (mean \pm SD 0.380 \pm 0.817) under UVB exposure was significantly higher compared to healthy skin. The use of either EH-MSCs or HA alone resulted in lower TNF- α and p21 gene expression compared to the UVB control group. However, the combination of both treatments demonstrated the lowest gene expression levels for both TNF- α (mean \pm SD 0.068 \pm 0.116) and p21 (mean \pm SD 0.191 \pm 0.306) compared to all other groups ($p < 0,05$).

Conclusion: The combination of EH-MSCs and HA significantly influences UVB-induced TNF- α and p21 gene expression in the skin of Wistar rats.

Keywords: collagen loss, EH-MSC, HA, p21, TNF- α , UVB radiation.

UNISSULA
جامعة سلطان أبوبوع الإسلامية

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penuaan pada kulit akibat paparan UVB atau *photoaging* merupakan salah satu masalah kesehatan kulit yang menyebabkan hilangnya kolagen (*collagen loss*). UVB merupakan sumber stres oksidatif yang menginduksi aktivasi *Nuclear Factor-kappa B* (NF- κ B) sehingga meningkatkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α). Peningkatan kadar TNF- α memperkuat respons inflamasi, mempercepat degradasi matriks ekstraseluler kulit, dan memicu apoptosis fibroblas, sehingga menyebabkan kerusakan jaringan kulit.^{1,2} Paparan UVB juga mengaktifkan ekspresi gen p53 sebagai supresor tumor dan menginduksi ekspresi gen p21 (CDKN1A) sebagai inhibitor kuat *cyclin-dependent kinase* (CDK).^{3,4} Peningkatan ekspresi p21 memicu penghentian siklus sel yang ireversibel (*cellular senescence*).^{4,5} Akumulasi sel-sel *senescent* menyebabkan penurunan aktivitas fibroblas, berkurangnya sintesis kolagen tipe I dan III, serta peningkatan aktivitas enzim *matrix metalloproteinase* (MMPs) yang mempercepat degradasi kolagen dan elastin, sehingga berkontribusi terhadap *collagen loss* dan penurunan elastisitas kulit.^{3,6} Peningkatan ekspresi gen TNF- α dan p21 pada *collagen loss* akibat terapi kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) dan *Hyaluronic Acid* (HA) belum banyak dikaji.

Collagen loss akibat paparan UVB (*photoaging*) menyebabkan penurunan kekencangan dan elastisitas kulit, sehingga kulit tampak kendur, muncul kerutan dan garis halus yang membuat wajah terlihat lebih tua dari usia kronologisnya.⁷

Collagen loss mengganggu fungsi protektif kulit terhadap sinar UV dan patogen, memperlambat penyembuhan luka, memperburuk inflamasi kronis, serta meningkatkan kerentanan terhadap infeksi.⁸ Pengaruh *collagen loss* secara psikologis dapat menurunkan kepercayaan diri dan berdampak pada kualitas hidup penderitanya. *Photoaging* merupakan masalah dermatologis dan psikososial yang signifikan di Indonesia. Prevalensi *photoaging* cukup tinggi, laporan PERDOSKI (2016) menyebutkan bahwa sekitar 80% penuaan dini di usia muda disebabkan oleh paparan sinar ultraviolet karena kondisi iklim tropis.⁹ Penelitian di RSUD Dr. Soetomo Surabaya (2019) menunjukkan mayoritas pasien *photoaging* berusia 45–60 tahun dengan keluhan kerutan, pigmentasi, dan kulit kusam. Oleh karena itu diperlukan upaya pengembangan terapi *collagen loss* akibat paparan UVB dengan agen baru yang lebih efektif dalam meningkatkan ekspresi gen penyebab kerusakan jaringan kulit.

Kondisi *hypoxia* (rendah oksigen) pada EH-MSCs memperkaya muatan bioaktif *exosome* seperti faktor pertumbuhan dan miRNA sehingga berpotensi sebagai agen anti-inflamasi dan pro-regenerasi yang lebih poten.¹⁸⁻²⁰ HA sebagai glikosaminoglikan non-sulfat yang mendominasi komposisi *Extracellular Matrix* (ECM), sehingga mempertahankan arsitektur tiga dimensi dermis. HA berikatan dengan reseptor permukaan sel seperti CD44 untuk memicu jalur sinyal intraseluler yang mempertahankan sintesis pro-kolagen..^{61 69} Yan *et al.* (2023) melaporkan bahwa *exosome* dari *bone marrow* MSC menurunkan ekspresi MMP dan menghambat degradasi kolagen pada kulit yang dipapar UV.⁴ Zhang *et al.* (2024) melaporkan bahwa *exosome* yang berasal dari *adipose* dan *umbilical cord*

MSC mampu menurunkan ROS, meningkatkan hidrasi, dan memperbaiki elastisitas kulit setelah paparan UVB.¹¹ Studi terbaru Huynh *et al.* (2025) menunjukkan bahwa *exosome* dari *hypoxia-induced adipose* MSC (Hypo-MSC-Exo) menekan kadar MDA, menurunkan ekspresi MMP, serta memperbaiki struktur dermis pada model tikus *photoaging*.¹² Namun, penelitian tentang penggunaan kombinasi EH-MSC dan HA terhadap ekspresi gen TNF- α dan p21 pada collagen loss akibat paparan UVB masih terbatas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen TNF- α dan p21 pada tikus model *collagen loss*. Tikus jantan galur Wistar yang dipapar lampu UVB dengan kekuatan 302 nm dengan dosis 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari, 5 kali seminggu selama 2 minggu digunakan sebagai model *collagen loss*. Ekspresi gen TNF- α dan p21 dianalisis menggunakan metode *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR). Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif terapi *photoaging* untuk menghilangkan *collagen loss* yang efektif untuk mencegah kerusakan kulit akibat paparan UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah "Apakah terdapat pengaruh kombinasi *exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) dan *Hyaluronic Acid* (HA) terhadap tingkat ekspresi gen TNF- α dan p21 pada tikus jantan galur Wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB?"

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap tingkat ekspresi gen TNF- α dan p21 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengukur dan membandingkan ekspresi gen TNF- α pada kulit tikus Wistar setelah perlakuan dengan kombinasi EH-MSCs dan HA, dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tunggal.
2. Mengukur dan membandingkan ekspresi gen p21 pada kulit tikus Wistar setelah perlakuan dengan kombinasi EH-MSCs dan HA, dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tunggal.
3. Menganalisis perbedaan efektivitas antara kelompok perlakuan kombinasi, kelompok tunggal EH-MSCs, dan kelompok HA.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi sumber informasi dan dasar penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen TNF- α dan p21 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan paparan UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian secara praktis diharapkan menjadi salah satu upaya pengembangan kombinasi EH-MSCs dan HA sebagai terapi baru untuk *collagen loss* akibat paparan UVB.

1.5. Originalitas Penelitian

Penelitian ini memiliki kebaruan jika dibandingkan dengan studi-studi sebelumnya di bidang terkait sebagaimana disajikan pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No.	Judul Penelitian	Metode penelitian	Hasil penelitian
1.	<i>Exosomes derived from human dermal fibroblasts protect against UVB - induced skin photoaging</i> (Park et al., 2023) ⁴⁵	<i>In vitro</i> (sel fibroblas manusia), <i>in vivo</i> (tikus SKH-1 hairless), dan model kulit rekonstruksi (Neoderm-ED)	Pemberian <i>exosome</i> dari fibroblas secara signifikan menurunkan stres oksidatif, kerusakan DNA, dan penuaan seluler (termasuk penurunan ekspresi <i>p21</i> dan <i>p16</i>). Pada model tikus, injeksi eksosom mengurangi pembentukan kerutan, menurunkan TEWL, menghambat penurunan kolagen/elastin, dan menekan ekspresi MMP-1.
2.	Pengaruh Pemberian MSCs-Exosome Hipoksia terhadap Ekspresi Gen IL-1 β dan Caspase 1 (Mustofa et al., 2024). ¹⁴	Studi eksperimental <i>in vivo</i> (tikus Wistar dipapar UVB, diberikan EH-MSCs)	Pemberian EH-MSCs menurunkan ekspresi gen IL-1 β dan Caspase 1 pada kulit tikus UVB dibanding kontrol, menunjukkan efek penekan <i>inflammasome</i> . Penelitian ini tidak mengukur p21 atau menggunakan HA sebagai aditif).
3.	Pengaruh Pemberian <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal</i>	Studi eksperimental <i>in vivo</i> (mencit C57BL, model hiperpigmentasi UVB, diberikan eksosom hipoksia MSC)	Pemberian <i>exosome hypoxia</i> MSC secara signifikan menurunkan ekspresi MIP-1 α dan penanda makrofag CD68,

	<i>Stem Cell</i> terhadap Ekspresi <i>MIP-1α</i> dan <i>CD68</i> (Sari <i>et al.</i> , 2024). ¹⁵		menunjukkan pengurangan peradangan makrofagik pada kulit yang dipigmentasi akibat UVB.
4	<i>Effects of Exosomes From Hypoxia-Induced Adipose-Derived Stem Cells on UVB-induced Photoaging in Mice</i> (Huynh <i>et al.</i> , 2025). ¹²	Studi eksperimental <i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i> (model tikus dipapar UVB & kultur fibroblas kulit)	<i>Exosome hypoxia Adipose-Derived Stem Cells</i> (hypADSC-Exo) menurunkan senescensi sel (berkurangnya aktivitas SA-β-gal), meningkatkan proliferasi fibroblas, menurunkan ekspresi <i>p21</i> dan <i>p16</i> , serta pada tikus memperbaiki kerutan, menipiskan epidermis/dermis, meningkatkan hidrasi, elastisitas, dan densitas kolagen dengan penurunan ekspresi MMP (1, 2, 3).
5.	<i>Hypoxia-conditioned mesenchymal stem cells (MSC) exosomes attenuate ultraviolet-B (UVB)-mediated malondialdehyde (MDA) and matrix metalloproteinase-1 (MMP)-1 upregulation in collagen loss models</i> (Angelina <i>et al.</i> , 2025). ¹³	Eksperimental <i>in vivo</i> (model tikus dipapar UVB, subkutan EH-MSC)	Pemberian EH-MSC secara signifikan menurunkan kadar MDA dan MMP-1 dibandingkan kontrol negatif (UVB saja). Hal ini menunjukkan bahwa <i>exosome hypoxia</i> memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi dalam mitigasi kerusakan kulit akibat UVB.

Huynh *et al.* (2025) melaporkan bahwa *exosome* yang dihasilkan dari *adipose-derived stem cells* (ADSC) yang dikondisikan dalam *hypoxia* terbukti memiliki efek protektif terhadap penuaan kulit (*photoaging*) yang diinduksi oleh

paparan UVB pada model tikus. Penelitian menunjukkan bahwa *exosome* ini bekerja melalui beberapa mekanisme utama yang berkontribusi pada perlindungan dan perbaikan jaringan kulit.¹²

Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana *exosome hypoxia* dari MSCs dikombinasi dengan HA sebagai terapi baru untuk *collagen loss* akibat *photoaging* yang diinduksi UVB. Penelitian terdahulu menyebutkan *exosome hypoxia* ADSC (hypADSC-Exo) menurunkan *senescent* sel (berkurangnya aktivitas SA- β -gal), meningkatkan proliferasi fibroblas, menurunkan ekspresi *p21* dan *p16*, serta pada tikus memperbaiki kerutan, menipiskan epidermis/dermis, meningkatkan hidrasi, elastisitas, dan densitas kolagen dengan penurunan ekspresi MMP (1, 2, 3).



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kolagen

2.1.1. Definisi Kolagen dan Tipe Kolagen

Kolagen adalah protein struktural yang paling melimpah di dalam tubuh manusia dan merupakan komponen utama dari *Extracellular Matrix* (ECM) di dermis kulit.^{16,17} Fungsinya adalah untuk memberikan kekuatan tarik (*tensile strength*), struktur, dan ketahanan pada jaringan, membentuk kerangka yang menopang sel-sel dan komponen ECM lainnya. Kolagen menyusun sekitar 75% dari berat kering kulit, menjadikannya penentu utama integritas dan penampilan kulit yang sehat.¹⁶

Kolagen dalam kulit manusia terdiri dari beberapa tipe, namun dua tipe yang paling dominan dan relevan dengan proses penuaan adalah Kolagen Tipe I dan Kolagen Tipe III. Kolagen Tipe I merupakan yang paling melimpah, mencakup 80-90% dari total kolagen kulit. Ia membentuk serat-serat tebal dan kuat yang bertanggung jawab atas kekuatan dan kekencangan kulit.¹⁶⁻¹⁹ Kolagen Tipe III, yang menyusun sekitar 8-12% dari total kolagen, membentuk serat-serat retikuler yang lebih tipis dan lebih elastis, sering ditemukan bersamaan dengan Kolagen Tipe I.¹⁶⁻¹⁸ Rasio antara Kolagen Tipe I dan Tipe III dapat menjadi penanda biologis yang canggih untuk kualitas kulit. Kulit muda dan sehat memiliki rasio Tipe I/III yang tinggi, sementara pada kulit yang menua atau dalam proses penyembuhan luka, rasio ini cenderung menurun, mengindikasikan pergeseran menuju matriks yang lebih rapuh dan mirip jaringan parut.

2.1.2. Sintesis dan Degradasi Kolagen

Homeostasis kolagen diatur oleh keseimbangan dinamis antara proses sintesis (produksi) dan degradasi (perombakan). Sintesis kolagen adalah fungsi utama dari sel-sel fibroblas dermal. Proses ini diatur secara ketat oleh berbagai jalur pensinyalan, dengan jalur TGF- β /Smad menjadi salah satu regulator positif yang paling penting.^{16,17}

Degradasi kolagen dimediasi oleh sekelompok enzim yang disebut *Matrix Metalloproteinases* (MMPs). MMP-1 (juga dikenal sebagai kolagenase-1) adalah enzim kunci yang menginisiasi perombakan Kolagen Tipe I dan III dengan memotong molekul heliks tripelnya.^{16,17} Fragmen-fragmen kolagen menjadi lebih rentan terhadap degradasi lebih lanjut oleh MMP lain, seperti MMP-3 dan MMP-9.¹⁶

Proses *photoaging* menggeser keseimbangan ke arah degradasi. Paparan radiasi UVB memicu produksi masif *Reactive Oxygen Species* (ROS) di dalam sel kulit. ROS ini mengaktifkan jalur pensinyalan intraseluler seperti MAPK dan faktor transkripsi seperti AP-1 dan NF- κ B.^{16,17} Aktivasi jalur-jalur ini secara langsung meningkatkan transkripsi dan sekresi MMP oleh fibroblas dan keratinosit, yang menyebabkan perombakan kolagen yang masif. Matriks kolagen yang utuh memberikan tegangan mekanis yang esensial bagi fibroblas, menjaga mereka tetap dalam bentuk yang teregang dan aktif secara metabolik. Ketika MMP memfragmentasi matriks ini, tegangan tersebut hilang, menyebabkan fibroblas "mengendur" dan hancur.^{16,20} Kondisi yang tidak terstimulasi secara mekanis ini, pada gilirannya, memberi sinyal pada fibroblas untuk mengurangi

sintesis kolagen baru dan justru meningkatkan produksi MMP lebih banyak lagi, sehingga mempercepat penghancuran matriks.^{16,20}

2.1.3. Peran Kolagen dalam Integritas Jaringan dan *Remodeling* Kulit yang Rusak

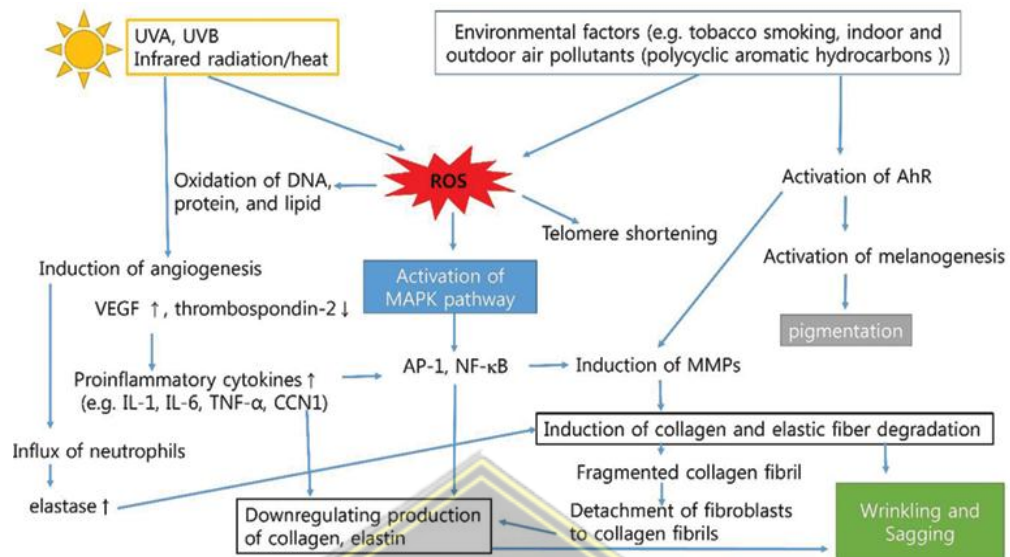
Integritas struktural, elastisitas, dan penampilan kulit yang muda bergantung pada jaringan kolagen yang padat, utuh, dan terorganisir dengan baik di dermis.^{16,20} Jaringan yang sehat dipertahankan melalui keseimbangan homeostatik yang cermat antara sintesis dan degradasi kolagen.^{16,21} Proses *photoaging*, menyebabkan keseimbangan rusak dengan laju degradasi yang jauh melampaui laju sintesis.^{16,17} Kondisi tersebut mengakibatkan hilangnya kolagen fungsional secara netto, yang secara klinis bermanifestasi sebagai kerutan, kulit kendur, dan penurunan kualitas kulit secara keseluruhan.

Fragmen-fragmen kolagen yang terdegradasi bukan hanya sisa-sisa yang tidak aktif; mereka adalah sinyal aktif dari kerusakan jaringan.²¹ Kemajuan dalam biologi molekuler telah menghasilkan alat diagnostik canggih, seperti *Collagen Hybridizing Peptides* (CHPs), yang dirancang untuk secara spesifik mengikat untaian kolagen yang telah terdenaturasi atau terdegradasi ini.²¹ Pendekatan tersebut memungkinkan deteksi dan kuantifikasi langsung dari kerusakan matriks, bukan hanya mengukur hilangnya kolagen utuh. Penggunaan teknik semacam ini dapat memberikan ukuran yang lebih spesifik tentang efektivitas suatu terapi dalam membersihkan matriks yang rusak dan mempromosikan perbaikan jaringan, sebuah titik akhir yang lebih canggih daripada sekadar mengukur kandungan kolagen total.

2.1.4. Efek *Photoaging* terhadap *Collagen Loss*

Integritas struktural dan kekencangan kulit bergantung pada jaringan padat serat kolagen di dermis. Mekanisme *photoaging* akibat paparan UVB disajikan pada Gambar 2.1. Paparan sinar ultraviolet (UVA dan UVB), panas inframerah, serta faktor lingkungan seperti polusi udara dan asap rokok meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) di kulit. Akumulasi ROS menginduksi stres oksidatif menyebabkan oksidasi DNA, protein, dan lipid, serta memperpendek telomer. Aktivasi jalur *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) oleh ROS memicu aktivasi faktor transkripsi AP-1 dan NF- κ B yang meningkatkan produksi sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6, TNF- α) dan *matrix metalloproteinases* (MMPs). Peningkatan MMPs mempercepat degradasi kolagen dan serat elastin, sedangkan AP-1 menekan sintesis kolagen baru. Proses ini menyebabkan hilangnya integritas dermis, pembentukan fibril kolagen yang terfragmentasi, serta detasemen fibroblas dari jaringan kolagen, yang secara klinis tampak sebagai kerutan (*wrinkling*) dan kulit mengendur (*sagging*).²²

Penuaan kulit merupakan proses biologis yang kompleks dan dipengaruhi oleh kombinasi antara faktor endogen (misalnya, penuaan kronologis) dan faktor eksogen (misalnya, dari agen eksternal, seperti sinar ultraviolet, agresi lingkungan, dan lain-lain). Salah satu mekanisme molekuler paling penting yang menyebabkan munculnya tanda-tanda fisik penuaan adalah degradasi enzimatik kolagen dan elastin. Proses degradasi ini terjadi sebagai akibat dari aktivitas enzim proteolitik yang berada di dalam *Extracellular Matrix* (ECM), utamanya adalah matriks metaloproteinase (MMPs) dan elastase (Gambar.2.1)⁵⁰



Gambar 2.1. Patogenesis Photoaging²²

2.2. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)

2.2.1. Definisi dan Struktur TNF- α

Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) adalah sitokin pro-inflamasi pleiotropik yang memainkan peran sentral dalam orkestrasi respons imun dan peradangan.^{23,24} Peneliti mengidentifikasi TNF- α karena kemampuannya menginduksi nekrosis pada sel tumor, dan kini molekul ini diakui sebagai regulator utama berbagai proses fisiologis maupun patologis.^{24,25} Sitokin ini diproduksi oleh berbagai jenis sel, namun sumber utamanya adalah sel-sel imun yang teraktivasi, seperti makrofag dan limfosit, serta sel-sel non-imun seperti keratinosit dan fibroblas kulit sebagai respons terhadap stres atau patogen.^{23,26}

TNF- α memiliki dua bentuk bioaktif yang berbeda. Awalnya, ia disintesis sebagai protein prekursor Tipe II yang terikat pada membran sel, dikenal sebagai *transmembrane TNF- α* (tmTNF- α), dengan berat molekul sekitar 26 kDa.^{23,25,27} Bentuk prekursor ini kemudian dapat diproses oleh enzim *TNF- α -converting*

enzyme (TACE), suatu metaloproteinase, yang memotong domain ekstraselulernya.²⁷ Proses tersebut melepaskan bentuk terlarut, yaitu *soluble TNF- α* (sTNF- α), sebuah polipeptida 157 asam amino dengan berat molekul 17 kDa.^{23,25} Kedua bentuk, baik yang terikat membran maupun yang terlarut, secara fungsional aktif sebagai homotrimer non-kovalen yang stabil.²³

Keberadaan dua bentuk TNF- α , yaitu bentuk terlarut (*soluble TNF- α* / sTNF- α) dan bentuk terikat membran (*transmembrane TNF- α* / tmTNF- α), menentukan dua mode pensinyalan yang berbeda secara fungsional. Mode pensinyalan memediasi cara TNF- α berinteraksi dengan sel target di jaringan. sTNF- α berdifusi melalui ruang antar sel dan bertindak pada sel yang jauh, sehingga berperan dalam pensinyalan endokrin maupun parakrin serta berkontribusi terhadap respons inflamasi sistemik. Respons inflamasi sistemik dipicu oleh sTNF- α menyebabkan peningkatan pelepasan sitokin proinflamasi lain dan memperkuat kondisi *inflammaging* pada kulit. Sebaliknya, tmTNF- α berikatan langsung dengan reseptor pada sel yang berdekatan melalui kontak sel-ke-sel, sehingga memediasi respons imun dan inflamasi yang bersifat lokal. Respons lokal sangat penting dalam konteks *photoaging*, karena tmTNF- α pada permukaan keratinosit yang terpapar UVB dapat secara langsung mengaktivasi fibroblas di sekitarnya. Aktivasi fibroblas tersebut kemudian menciptakan area degradasi matriks ekstraseluler yang intens, yang pada akhirnya mempercepat kerusakan kolagen dan elastin dermal.²³

2.2.2. Fungsi TNF- α

Fungsi TNF- α pada kondisi akut, seperti infeksi atau cedera jaringan, pelepasan TNF- α yang terkontrol sangat bermanfaat. Ia menginisiasi kaskade inflamasi yang penting untuk pertahanan tubuh, merekrut sel-sel imun ke lokasi infeksi, dan memfasilitasi pembersihan patogen. Namun, ketika produksinya menjadi kronis dan tidak teregulasi, seperti yang terjadi pada paparan UVB berulang pada kulit, fungsi protektif ini berubah menjadi destruktif.^{23,27,28}

TNF- α mengatur berbagai proses seluler fundamental. Ini termasuk induksi apoptosis (kematian sel terprogram), regulasi proliferasi dan diferensiasi sel, serta stimulasi produksi sitokin dan kemokin lainnya, yang memperkuat respons inflamasi.²³ Patologi yang terkait dengan TNF- α tidak terletak pada sitokin itu sendiri, melainkan pada disregulasi ekspresinya. Peningkatan kadar TNF- α secara kronis merupakan ciri khas dari berbagai penyakit autoimun dan inflamasi kronis, termasuk rheumatoid arthritis dan penyakit Crohn.^{23,27} Oleh karena itu, tujuan terapi modern yang menargetkan TNF- α , termasuk yang diusulkan dalam penelitian ini, bukanlah eliminasi total, melainkan modulasi aktivitasnya untuk mengembalikan homeostasis jaringan.

2.2.3. Jalur Reseptor TNF- α

TNF- α mengerahkan efek biologisnya yang beragam dengan mengikat dua jenis reseptor permukaan sel yang berbeda secara struktural dan fungsional: *TNF Receptor 1* (TNFR1 atau p55) dan *TNF Receptor 2* (TNFR2 atau p75).^{23,24,29}

TNFR1 diekspresikan secara luas di hampir semua jenis sel dan dapat diaktifkan oleh sTNF- α maupun tmTNF- α . Reseptor ini dianggap sebagai

mediator utama dari sebagian besar aktivitas pro-inflamasi dan sitotoksik TNF- α . Keunikan TNFR1 terletak pada keberadaan "domain kematian" (*death domain*) intraseluler, yang setelah aktivasi dapat merekrut protein adaptor untuk menginisiasi jalur pensinyalan yang mengarah pada apoptosis atau aktivasi transkripsi gen pro-inflamasi.²⁴

Eksresi TNFR2 lebih terbatas, terutama ditemukan pada sel-sel imun (seperti sel T regulator), sel endotel, dan neuron.^{27,30} TNFR2 secara preferensial diaktifkan oleh tmTNF- α melalui interaksi sel-ke-sel.^{4 8} Jalur pensinyalan yang diinisiasi oleh TNFR2 umumnya dikaitkan dengan fungsi homeostatik dan regeneratif, seperti kelangsungan hidup sel, proliferasi, dan modulasi respons imun untuk menekan peradangan berlebih.^{27,30}

Pengikatan TNF- α ke salah satu reseptor memicu kaskade pensinyalan intraseluler yang kompleks. Dua jalur utama yang paling dikenal adalah jalur *Nuclear Factor-kappa B* (NF- κ B) dan jalur *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK).²⁴ Aktivasi NF- κ B dan MAPK translokasi faktor transkripsi ke nukleus, di mana mereka mengatur ekspresi ratusan gen yang terlibat dalam inflamasi, kelangsungan hidup, dan apoptosis. Perbedaan fungsi antara TNFR1 dan TNFR2 menawarkan target terapeutik yang lebih canggih. Terapi yang ideal mungkin tidak hanya memblokir TNF- α secara non-spesifik, tetapi secara selektif menekan pensinyalan TNFR1 yang merusak sambil mempertahankan atau bahkan meningkatkan pensinyalan TNFR2 yang bersifat regeneratif. Eksosom, dengan muatan molekuler yang kompleks, berpotensi memberikan modulasi yang lebih halus ini dibandingkan dengan inhibitor molekul kecil.

2.2.4. Jalur Inflamasi pada Photoaging dan Peran TNF- α

TNF- α mengaktifkan AP-1, stres oksidatif akibat UVB juga merupakan aktivator kuat dari faktor transkripsi Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B).^{31,32} NF- κ B terikat oleh protein inhibitor I κ B di sitoplasma dalam kondisi istirahat . Stres oksidatif memicu fosforilasi dan degradasi proteasomal I κ B, yang memungkinkan NF- κ B untuk bertranslokasi ke nukleus.¹ Di dalam nukleus, NF- κ B mengikat elemen promotor dari berbagai gen pro-inflamasi, memicu produksi dan pelepasan sitokin seperti *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), dan Interleukin-6 (IL-6).^{1,2} TNF- α memegang peranan sentral dan pleiotropik dalam patogenesis photoaging. Sitokin ini tidak hanya merekrut sel-sel imun dan memperkuat respons inflamasi, tetapi juga secara langsung berkontribusi pada kerusakan ekstraseluler matrix dengan lebih lanjut merangsang produksi MMP oleh fibroblas dan keratinosit.^{2,33} TNF- α dapat menginduksi apoptosis pada fibroblas dermal, sel-sel yang bertanggung jawab atas produksi kolagen, melalui jalur reseptor kematian yang menciptakan peradangan kronis tingkat rendah yang merusak, sebuah fenomena yang dikenal sebagai "*inflammaging*", yang menjadi ciri khas dari penuaan jaringan, termasuk kulit.^{1,33}

2.3. Gen p21 (CDKN1A)

2.3.1. Definisi dan Peran Gen p21

Gen p21 atau *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A* (CDKN1A), WAF1, atau CIP1, mengkodekan protein kecil dengan panjang sekitar 164 asam amino yang berfungsi sebagai inhibitor poten dari cyclin-dependent kinases (CDKs).^{34,35}, p21 berperan sebagai inhibitor utama siklus sel, sehingga penting untuk menjaga

kestabilan proliferasi sel dan homeostasis jaringan. Interaksi langsung dengan kompleks siklin–CDK menjalankan fungsi penghambatan, terutama CDK2 dan CDK4, yang mengatur transisi sel dari fase G1 menuju fase S dalam siklus seluler. P21 menghentikan kemajuan siklus sel pada fase G1, sehingga mengontrol laju proliferasi dan menjaga keseimbangan antara pertumbuhan dan diferensiasi sel.³⁶ Penelitian lain menunjukkan bahwa p21 juga dapat dilepaskan dari kompleks Cyclin D–CDK4 pada penggunaan inhibitor CDK4/6 yang memfasilitasi penghambatan lanjutan terhadap CDK2. Mekanisme tersebut memperkuat bukti bahwa p21 memiliki fungsi regulator kompleks dalam pensinyalan siklus sel dan homeostasis jaringan.^{4,37}

P21 berfungsi dalam regulasi transkripsi, perbaikan DNA, dan pengendalian apoptosis, menjadikannya molekul multifungsi yang sangat kontekstual.³⁴ Aktivitas biologis p21 bergantung pada lokalisasi subselulernya: ketika berada di nukleus, p21 umumnya bertindak sebagai penekan tumor dengan menginduksi penghentian siklus sel; sebaliknya, akumulasi p21 di sitoplasma dapat menimbulkan efek yang berlawanan, seperti menghambat apoptosis dan mendorong kelangsungan hidup sel, yang dalam kondisi tertentu justru dapat mendukung perkembangan kanker.³⁴ P21 dapat dinilai berdasarkan pada tingkat ekspresinya dan mempertimbangkan lokalisasi, interaksi molekuler, dan konteks fisiologis tempat ia berperan.

2.3.2. Regulasi Ekspresi Gen p21

Jalur utama yang menginduksi ekspresi gen p21 adalah melalui aktivasi protein penekan tumor p53. Sebagai respons terhadap berbagai bentuk stres

seluler, terutama kerusakan DNA seperti yang disebabkan oleh radiasi UVB, protein p53 akan teraktivasi dan terstabilisasi.^{3,38} p53 yang aktif kemudian berfungsi sebagai faktor transkripsi, berikatan langsung dengan elemen responsif pada promotor gen p21 dan secara dramatis meningkatkan transkripsinya.³⁸ Poros p53-p21 ini merupakan komponen inti dari *DNA Damage Response* (DDR), sebuah mekanisme fundamental yang menjaga integritas genom dengan menghentikan siklus sel untuk memberikan waktu bagi perbaikan DNA.³⁸

Paparan UVB adalah pemicu utama kerusakan DNA pada sel-sel kulit. Oleh karena itu, peningkatan kadar p21 pada kulit yang terpapar sinar matahari dapat dilihat sebagai penanda molekuler langsung dari beban kerusakan DNA kumulatif dan upaya sel untuk mengatasi stres tersebut dengan memasuki kondisi henti tumbuh. Selain jalur p53, ekspresi p21 juga dapat diinduksi secara independen dari p53 melalui jalur lain, seperti pensinyalan *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β).

2.3.3. Fungsi p21 dalam Siklus Sel dan Penuaan Seluler

Penghentian siklus sel yang dimediasi oleh p21 memberikan jeda waktu yang penting bagi sel untuk mengaktifkan mekanisme perbaikan DNA dan memperbaiki kerusakan sebelum DNA yang rusak tersebut direplikasi pada fase S, yang dapat menyebabkan mutasi permanen. Jika kerusakan bersifat ringan dan masih dapat diperbaiki, kadar p21 akan menurun sehingga sel dapat kembali melanjutkan siklusnya. Namun, jika kerusakan bersifat berat atau menetap dan tidak dapat diperbaiki, ekspresi p21 yang berkelanjutan menjadi pendorong utama transisi sel menuju keadaan penuaan seluler suatu kondisi henti tumbuh yang

bersifat permanen dan ireversibel.^{3,38,39}

P21 berperan dalam menginduksi penuaan seluler dan mempertahankan viabilitas atau kelangsungan hidup sel-sel yang telah berada dalam keadaan tersebut.³ Penghilangan p21 pada sel yang mengalami penuaan seluler akibat kerusakan DNA tidak mengembalikan sel ke kondisi normal, tetapi justru memicu kematian sel. Mekanisme di balik fenomena ini mengungkap adanya hubungan langsung antara p21 dan TNF- α . Hilangnya p21 pada sel yang menua menyebabkan aktivasi jalur NF- κ B, yang kemudian meningkatkan sekresi TNF- α . TNF- α selanjutnya bertindak secara autokrin atau parakrin untuk menginduksi apoptosis pada sel-sel yang telah mengalami penuaan. Ketidakseimbangan dalam mekanisme ini dapat menjadi faktor pendorong utama terjadinya proses penuaan inflamasi (*inflammaging*).³ Pemahaman ini memberikan dasar ilmiah yang kuat untuk meneliti bagaimana terapi kombinasi yang diusulkan dapat memodulasi poros p21-TNF- α dalam upaya memulihkan homeostasis kulit.

2.3.4. Penuaan Seluler pada *Photoaging* dan Peran Gen p21

Kerusakan DNA yang diinduksi UVB, seperti pembentukan dimer pirimidin siklobutana (CPDs), mengaktifkan mekanisme pertahanan seluler yang dikenal sebagai *DNA Damage Response* (DDR).³ Sensor utama DDR, seperti protein *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), akan mengaktifkan dan menstabilkan protein supresor tumor p53.³ Protein p53 yang teraktivasi berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengikat elemen promotor pada gen CDKN1A dan meningkatkan ekspresi protein p21.^{3,4} Protein p21 adalah inhibitor poten dari

kompleks *cyclin-dependent kinase* (CDK), terutama CDK2. Dengan menghambat aktivitas CDK2, p21 mencegah fosforilasi protein Retinoblastoma, sehingga menjaga dalam keadaan aktif yang mengikat faktor transkripsi E2F. Hal ini secara efektif menghentikan sel untuk maju dari fase G1 ke fase S dalam siklus sel.¹³ Penghentian siklus sel yang stabil dan bersifat ireversibel ini adalah definisi dari *cellular senescence*.⁴ Akumulasi sel-sel *senescent* di kulit yang terpapar UV berkontribusi signifikan terhadap fenotipe penuaan, tidak hanya karena mereka berhenti berproliferasi, tetapi juga karena mereka mengembangkan *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP), yaitu sekresi berbagai molekul pro-inflamasi (TNF- α) dan degradatif (MMPs) yang merusak jaringan di sekitarnya.^{3,6} Penelitian mendalam menunjukkan bahwa p21 juga esensial untuk menjaga kelangsungan hidup sel yang sudah berada dalam kondisi *senescent*.^{3,40} Ketika ekspresi p21 ditekan pada sel *senescent*, sel-sel ini mencoba untuk masuk kembali ke siklus sel meskipun DNA mereka sudah rusak parah. Kegagalan replikasi respons kerusakan DNA sekunder yang masif, yang pada gilirannya mengaktifkan jalur NF- κ B/TNF- α . Aktivasi ini selanjutnya memicu JNK dan kaspase, yang berujung pada kematian sel terprogram (apoptosis).^{3,40} Implikasi dari mekanisme ini sangat penting karena intervensi yang mampu menurunkan ekspresi p21 tidak hanya berpotensi mencegah sel baru menjadi *senescent* (*senomorphic*), tetapi juga dapat secara aktif membersihkan sel-sel *senescent* yang sudah ada dengan mengganggu mekanisme pertahanan hidup mereka, suatu efek yang dikenal sebagai *senolytic*.³

2.4. *Mesenchymal Stem Cell (MSC) dan Exosome*

2.4.1. Definisi dan Karakteristik *Mesenchymal Stem Cells (MSC)*

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) adalah sel punca dewasa multipoten yang dapat diisolasi dari berbagai jaringan, termasuk sumsum tulang, jaringan adiposa, tali pusat, dan pulpa gigi.⁴¹ *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* telah menetapkan kriteria minimum untuk mendefinisikan MSC pada manusia (Gambar 2.2), yaitu: (1) kemampuan untuk melekat pada permukaan plastik dalam kondisi kultur standar; (2) ekspresi penanda permukaan spesifik, yaitu positif ($\geq 95\%$) untuk CD105, CD90, dan CD73, serta negatif ($\leq 2\%$) untuk penanda hematopoietik dan imunologis seperti CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD19 atau CD79 α , dan HLA-DR; dan (3) kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tiga garis keturunan sel mesodermal, yaitu osteoblas (tulang), kondrosit (tulang rawan), dan adiposit (lemak) secara *in vitro*.⁴¹⁻⁴³



Gambar 2.2. Kriteria minimum ISCT untuk mengidentifikasi Sel Punca Mesenkimal manusia⁴¹

2.4.2. Definisi, Biogenesis, dan Komposisi *Exosome* MSC

Exosome adalah subtype dari vesikel ekstraseluler yang berukuran nano, dengan diameter berkisar antara 30 hingga 150 nm.^{44,45} Mereka berasal dari jalur

endosomal internal sel. Proses biogenesisnya dimulai dengan invaginasi ke dalam dari membran endosom awal untuk membentuk *multivesicular bodies* (MVBs), yang berisi banyak vesikel kecil yang disebut intraluminal vesicles (ILVs).^{32,34} Pembentukan ILV ini diatur oleh mekanisme molekuler yang kompleks, termasuk jalur yang bergantung pada *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* (ESCRT) dan jalur yang tidak bergantung pada ESCRT.^{44,46} MVB kemudian dapat berfusi dengan membran plasma sel, melepaskan ILV yang dikandungnya ke lingkungan ekstraseluler, yang kemudian dikenal sebagai *exosome*.^{44,46} *Exosome* berfungsi sebagai pembawa pesan antar sel yang poten, karena mereka mengangkut muatan molekul bioaktif yang beragam termasuk protein, lipid, mRNA, dan microRNA (miRNA) yang mencerminkan status fisiologis sel induknya.^{44,45,47}

2.4.3. Peran *Exosome* MSC dalam Regenerasi dan Sintesis Kolagen Kulit

Awalnya, efek terapeutik MSC diyakini berasal dari kemampuannya untuk berdiferensiasi menjadi sel pengganti. Namun, bukti yang berkembang menunjukkan bahwa manfaat utamanya dimediasi oleh efek parakrin, yaitu sekresi faktor-faktor bioaktif, dengan *exosome* sebagai komponen fungsional utamanya.^{12,48,49} *exosome* yang diturunkan dari MSC (MSC-Exos) menawarkan pendekatan terapi bebas sel yang menjanjikan, yang dapat menghindari potensi risiko yang terkait dengan transplantasi sel hidup, seperti respons imun, penolakan, dan tumorigenitas.^{47,50} Pada regenerasi kulit, EH-MSCs telah terbukti memberikan berbagai manfaat. Mereka dapat merangsang proliferasi dan migrasi sel-sel kulit esensial seperti fibroblas dan keratinosit, meningkatkan sintesis

komponen ECM seperti kolagen dan elastin, menekan ekspresi MMP yang merusak, serta memodulasi respons inflamasi dan stres oksidatif secara efektif.^{47,50-53}

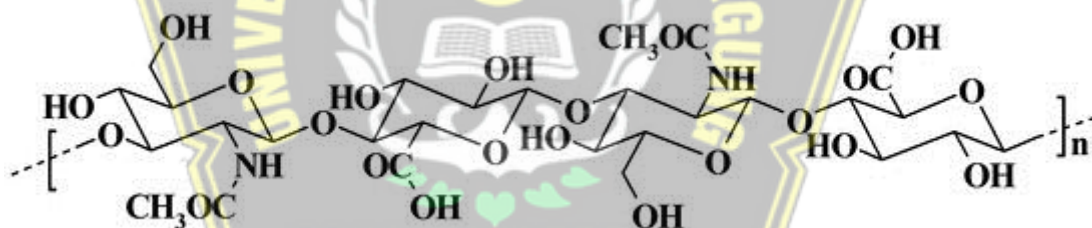
2.4.4. Pengaruh Kultur Hipoksia terhadap Potensi Terapeutik *Exosome* MSCs

Prakondisi hipoksia adalah sebuah strategi untuk atau meningkatkan potensi terapeutik MSC sebelum isolasi *exosome*. Dengan mengkultur MSC dalam lingkungan rendah oksigen (umumnya 1-5% O₂), kondisi yang meniru lingkungan mikro jaringan yang cedera atau iskemik, terjadi stabilisasi dan aktivasi faktor transkripsi *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α).^{18,20} HIF-1 α yang aktif akan memicu transkripsi ratusan gen yang terlibat dalam proses perbaikan dan regenerasi jaringan, termasuk faktor-faktor angiogenik seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), faktor pertumbuhan, dan sitokin anti-inflamasi.^{54,55} Akibatnya, *exosome* yang disekresikan oleh MSC yang diprakondisi hipoksia menjadi sangat diperkaya dengan muatan pro-regeneratif ini. Muatan ini mencakup protein dan miRNA spesifik (seperti miR-210, miR-126, dan miR-21) yang secara kolektif meningkatkan angiogenesis, menekan apoptosis, memodulasi respons imun ke arah anti-inflamasi, dan meningkatkan perbaikan jaringan.^{54,55} Sejumlah penelitian telah secara konsisten menunjukkan bahwa EH-MSCs memiliki kapasitas regeneratif yang jauh lebih unggul dibandingkan dengan *exosome* dari MSC yang dikultur dalam kondisi normoksia.^{54,55}

2.5. Hyaluronic Acid

2.5.1. Definisi, Struktur, dan Sifat Fisikokimia

Hyaluronic Acid (HA), atau hialuronan, adalah polisakarida linier yang termasuk dalam keluarga *glikosaminoglikan* (GAG) non-sulfat. Strukturnya HA (Gambar 2.3) terdiri dari unit-unit disakarida yang berulang dari asam D-glukuronat dan N-asetil-D-glukosamin, yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4 dan β -1,3.^{37,38} Sifat fisikokimia yang paling menonjol dari HA adalah hidrofilisitasnya yang luar biasa. Karena banyaknya gugus hidroksil dan karboksil di sepanjang rantainya, satu molekul HA mampu mengikat molekul air hingga 1000 kali beratnya sendiri, membentuk larutan gel yang sangat kental dan viskoelastik di lingkungan fisiologis.⁵⁶⁻⁵⁸



Gambar 2.4. Struktur Kimia *Hyaluronic Acid*²⁷

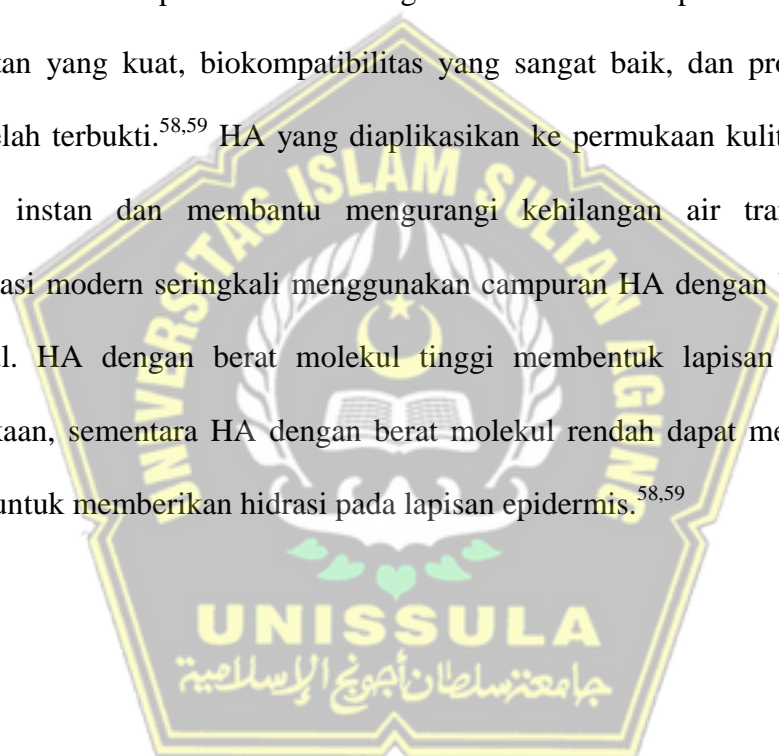
2.5.2. Peran Fisiologis *Hyaluronic Acid* di Kulit

Hyaluronic Acid adalah komponen fundamental dan melimpah dari matriks ekstraseluler (ECM) kulit, di mana lebih dari 50% dari total HA tubuh ditemukan.³⁷ Secara fisiologis, peran utamanya adalah untuk menjaga hidrasi, turgor (kekenyalan), dan volume kulit. Dengan mengisi ruang antar sel di dermis, HA menciptakan lingkungan yang lembab dan terhidrasi yang penting untuk fungsi seluler, termasuk proliferasi, migrasi, dan komunikasi sel.⁵⁹⁻⁶¹ Seiring dengan penuaan, baik intrinsik maupun ekstrinsik (photoaging), sintesis HA oleh

fibroblas dan keratinosit mengalami penurunan. Penurunan kadar HA ini berkontribusi secara signifikan terhadap manifestasi klinis penuaan kulit, seperti kekeringan, atrofi, hilangnya volume, dan pembentukan kerutan.⁵⁹⁻⁶¹

2.5.3. Penggunaan *Hyaluronic Acid* sebagai Agen Terapeutik

Hyaluronic Acid (HA) menjadi salah satu bahan aktif yang paling banyak digunakan dalam produk dermatologi dan kosmetik topical karena bersifat humektan yang kuat, biokompatibilitas yang sangat baik, dan profil keamanan yang telah terbukti.^{58,59} HA yang diaplikasikan ke permukaan kulit, memberikan hidrasi instan dan membantu mengurangi kehilangan air transepidermal.⁵⁹ Formulasi modern seringkali menggunakan campuran HA dengan berbagai berat molekul. HA dengan berat molekul tinggi membentuk lapisan pelindung di permukaan, sementara HA dengan berat molekul rendah dapat menembus lebih dalam untuk memberikan hidrasi pada lapisan epidermis.^{58,59}



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Photoaging merupakan salah satu bentuk penuaan kulit ekstrinsik akibat paparan ultraviolet B (UVB). Absorpsi energi UVB oleh kromofor seluler memicu produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Akumulasi ROS menyebabkan stres oksidatif yang berdampak pada kerusakan DNA, protein, dan lipid membran, sehingga mengganggu fungsi sel, dan menginisiasi aktivasi jalur sinyal pro-inflamasi dan pro-senescent^{16,20}

Peningkatan produksi ROS mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor-kappa B* (NF- κ B) dan, peningkatan produksi *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α)^{31,32} menginduksi *matrix metalloproteinases* (MMPs) sehingga memperburuk degradasi matriks ekstraseluler dan menginduksi apoptosis fibroblas yang mempercepat kehilangan kolagen dermal.^{32,54,62}

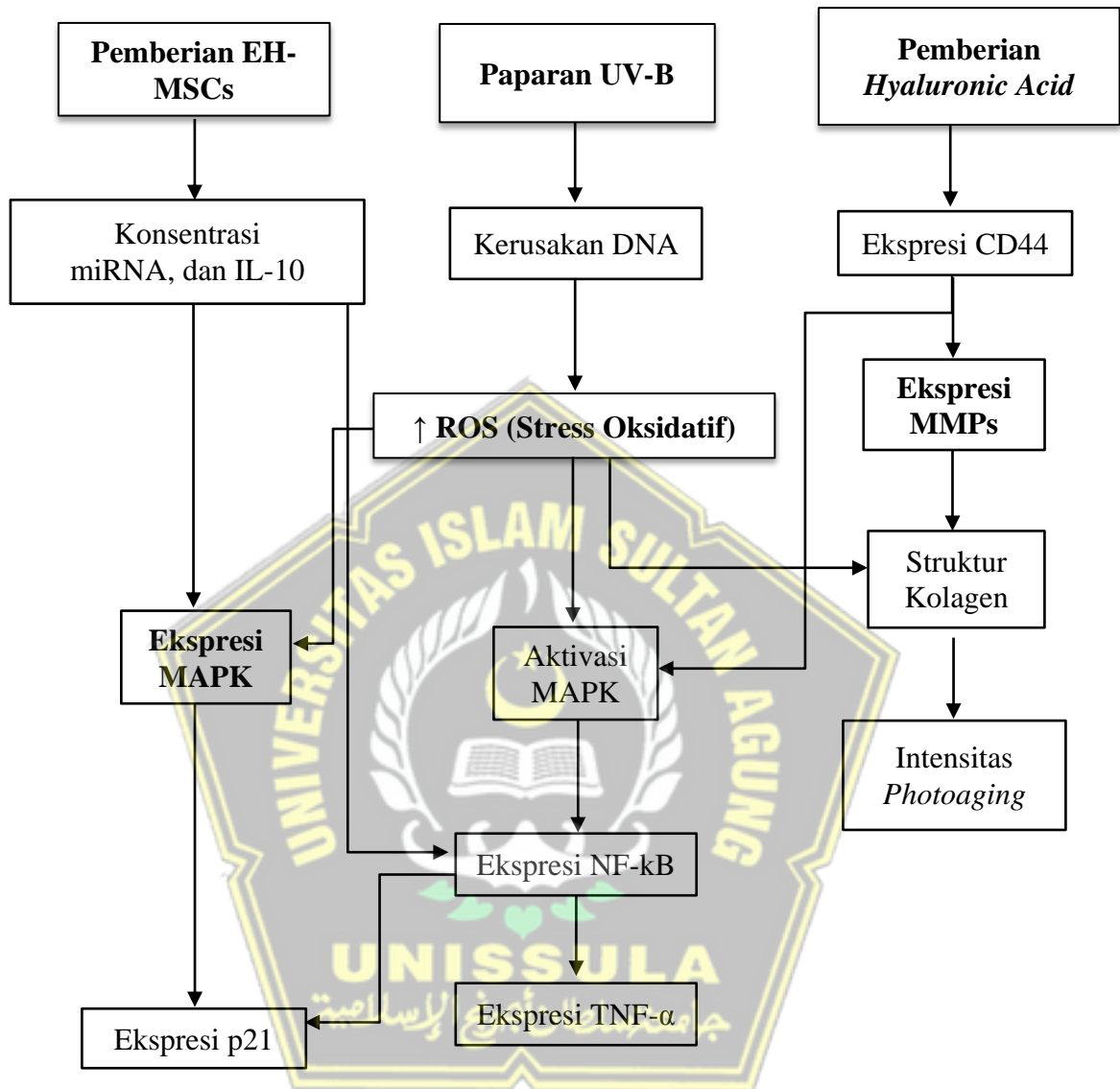
Paparan UVB memicu *DNA Damage Response* melalui aktivasi protein p53 sehingga meningkatkan ekspresi gen p21, yang berfungsi sebagai inhibitor *cyclin-dependent kinase*.^{3,4} Peningkatan p21 menghambat progresi siklus sel dan memicu keadaan *cellular senescence*. Sel-sel *senescent* tidak dapat berproliferasi, tetapi tetap aktif secara metabolik mensekresikan *senescence-associated secretory phenotype* (SASP). Akumulasi sel senesen memperparah kerusakan dermal dan berkontribusi pada manifestasi klinis *photoaging*.^{3,6}

Perkembangan terapi regeneratif berbasis *Exosomes Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) menawarkan pendekatan inovatif untuk mengatasi

mekanisme patologis tersebut.⁴⁷ EH-MSCs mengandung berbagai faktor bioaktif seperti microRNA, protein anti-inflamasi, dan antioksidan yang mampu menekan ROS, menghambat aktivasi NF- κ B, serta menurunkan ekspresi TNF- α . Selain itu, EH-MSCs dapat meningkatkan viabilitas fibroblas, merangsang proliferasi, dan mengembalikan homeostasis kolagen.^{48,55}

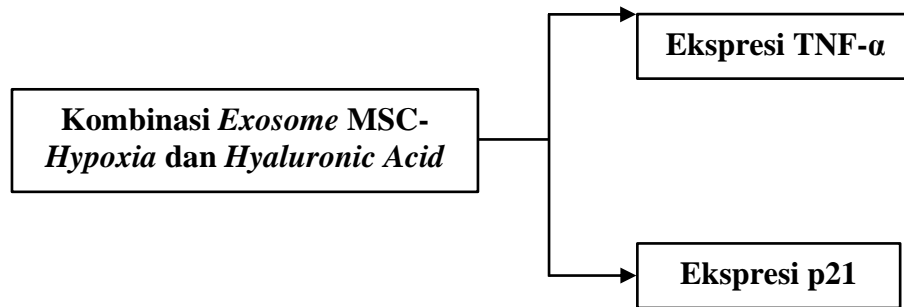
Hyaluronic Acid (HA) berperan sebagai komponen fisiologis matriks dermal yang menjaga hidrasi dan sebagai sistem penghantaran bioaktif. Sifat hidrofilik dan kemampuan membentuk hidrogel menjadikan HA sebagai carrier yang efektif untuk exosom, memperlambat degradasi, memperpanjang retensi lokal, dan mendukung pelepasan bertahap muatan *exosome*.^{61,63}

Kombinasi EH-MSCs dan HA diharapkan memberikan efek sinergis, dengan menurunkan ekspresi TNF- α dan p21 lebih efektif dibandingkan pemberian tunggal. Kombinasi terapi diharapkan menjadi strategi regeneratif pada mekanisme inflamasi senescent dalam photoaging, dan memperbaiki integritas kolagen dermal.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

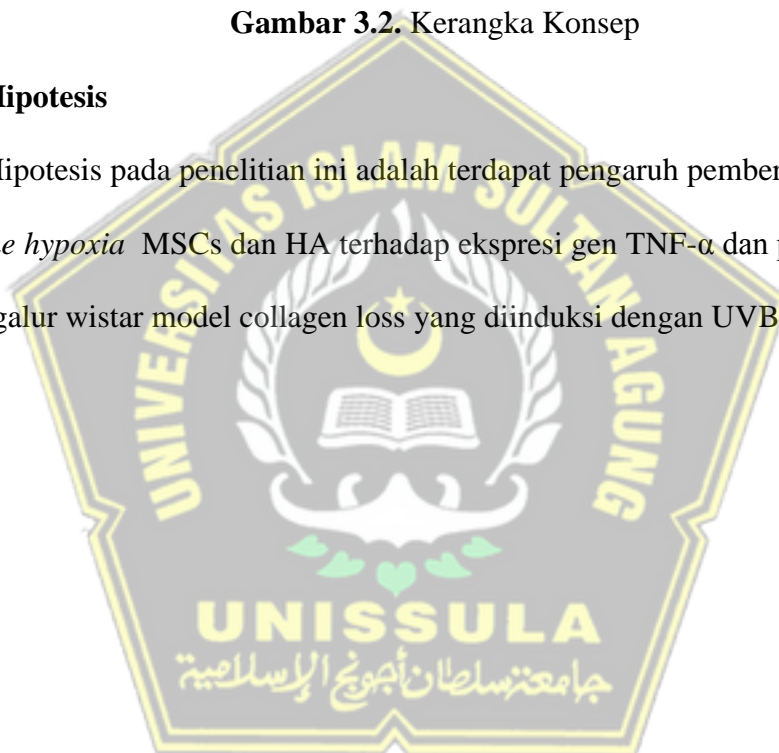
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat pengaruh pemberian kombiansi *exosome hypoxia* MSCs dan HA terhadap ekspresi gen TNF- α dan p21 pada tikus jantan galur wistar model collagen loss yang diinduksi dengan UVB.

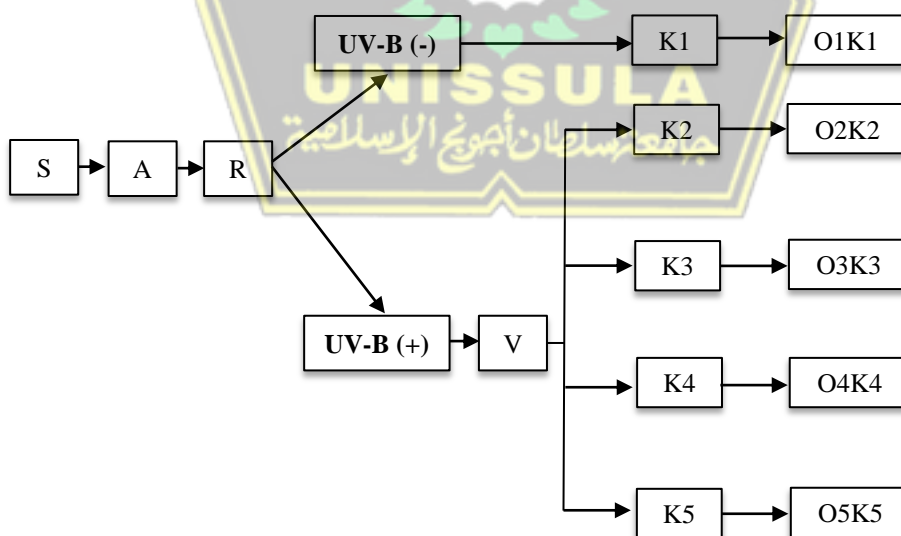


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni (*true experimental research*) yang dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan. Model penelitian yang digunakan adalah model *photoaging* atau *collagen loss* yang diinduksi melalui paparan sinar ultraviolet B (UVB). Penelitian eksperimental dipilih karena memungkinkan peneliti untuk mengontrol variabel secara ketat dan mengevaluasi pengaruh perlakuan terhadap variabel terikat dalam kondisi yang terstandar. Rancangan penelitian yang diterapkan adalah *post-test only control group design* dengan rancangan acak lengkap (RAL) sebagaimana disajikan pada Gambar 4.1:



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

- S : *Sampling*
 R : *Randomized*
 UVB (+) : Pemberian paparan UVB
 UVB (-) : Tanpa paparan UVB
 A : Aklimasi
 V : Validasi pembentukan anomal model *collagen loss*
 K1 : Tikus sehat tanpa paparan UVB
 K2 : Kontrol negatif (Tikus dengan paparan UVB + injeksi NaCl 0,9% 200 µL secara subcutan)
 K3 : Kontrol positif (Tikus dengan paparan UVB + injeksi *Hyaluronic Acid* (HA) dosis 200uL secara subcutan)
 K4 : Perlakuan 1 (Tikus dengan paparan UVB + injeksi *Exosome MSC hypoxia* dosis 2.5×10^5 sel dalam 200uL NaCl 0,9% secara subcutan)
 K5 : Perlakuan 2 (Tikus dengan paparan UVB + injeksi *Exosome MSC hypoxia* dosis 2.5×10^5 sel dalam 200uL NaCl 0,9% dan *Hyaluronic Acid* (HA) dosis 200uL secara subcutan)
 O1K1 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan p21 kelompok 1
 O2K2 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan p21 kelompok 2
 O3K3 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan p21 kelompok 3
 O4K4 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan p21 kelompok 4
 O5K5 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan p21 kelompok 5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**4.2.1. Variabel Penelitian**

4.2.1.1. Variabel Bebas

Kombinasi EH-MSCs dan HA.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat: Ekspresi gen TNF- α dan p21.

4.2.2. Definisi Operasional4.2.2.1. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells hypoxia*

Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs) adalah sediaan cair yang mengandung vesikel ekstraseluler berukuran nano (30–150 nm) yang dilepaskan oleh MSCs yang dikultur dalam kondisi hipoksia terkontrol (1–5%

O₂). EH-MSCs diperoleh dari *Animal Model Research Center, Stem Cell and Cancer Research (SCCR)*, Semarang. EH-MSCs diperoleh melalui proses isolasi dan medium kultur supernatan sel MSC *passage* ke-4, melalui teknik sentrifugasi diferensial dan filtrasi steril menggunakan membran 0,22 µm (Lampiran 1). EH-MSCs yang dihasilkan kemudian disuspensikan dalam larutan buffer fosfat disimpan pada suhu 2–8°C digunakan untuk perlakuan pada hewan coba. Pemberian E-MSCs dilakukan melalui injeksi subkutan pada area punggung tikus model sebanyak 200 µL per ekor per hari.

Satuan : mikroliter (µL)

Skala : Rasio

4.2.2.2. *Hyaluronic Acid*

Hyaluronic Acid (HA) merupakan sediaan injeksi steril berbentuk gel viskoelastik transparan yang digunakan untuk terapi regeneratif kulit. HA yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari sediaan dalam kemasan syringe steril bermerk Staris® kemasan 24 mg/ml (Lampiran 2) dan disimpan pada suhu 2–8°C sebelum digunakan. Pemberian HA melalui injeksi subkutan pada area punggung tikus model sebanyak 200 µL/ekor /hari.

Satuan : mikroliter (µL)

Skala : Rasio

4.2.2.3. Ekspresi gen TNF-α

Ekspresi gen TNF-α adalah tingkat transkripsi gen *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF-α), yaitu sitokin proinflamasi utama yang berperan dalam respon inflamasi kronis kulit akibat paparan UV-B. Pengukuran TNF-α menggunakan

metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dari sampel jaringan kulit dorsal tikus yang diambil pada hari ke-20 setelah perlakuan. Hasil pemeriksaan disajikan dalam bentuk ekspresi relatif dengan membandingkan ekspresi gen TNF- α terhadap ekspresi *housekeeping gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) dengan rumus:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Keterangan:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{TNF-}\alpha} - Ct_{\text{GAPDH}})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{sampel perlakuan}} - Ct_{\text{sampel kontrol}})$$

Skala : rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen p21

Ekspresi gen p21 adalah tingkat transkripsi gen *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A* (CDKN1A) yang diekspresikan menjadi protein p21. Pengukuran Ekspresi gen p21 menggunakan metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan dari sampel jaringan kulit dorsal tikus (± 5 mg) yang diambil pada hari ke-20 pasca perlakuan. Hasil berupa nilai ekspresi relatif dengan membandingkan ekspresi gen p21 terhadap ekspresi *housekeeping gene* GAPDH.

Skala : rasio

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan tikus jantan Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan

untuk penelitian yang diperoleh dari *Animal Model Research Center, Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* (Lampiran 3).

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Umur 2-3 bulan.
2. Kondisi sehat.
3. Berat badan 200-250 gr.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria Eksklusi pada penelitian ini adalah tikus yang mengalami infeksi selama penelitian

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Kriteria *Drop Out* pada penelitian ini adalah tikus yang mati.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan Galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok 1 (tikus sehat tanpa paparan UVB), Kontrol Negatif (tikus dipapar UVB dengan pemberian NaCl 0.9% secara subkutan), Kontrol positif (tikus dipapar UVB dengan pemberian HA dosis 200 uL secara subkutan), kelompok perlakuan 1 (tikus dipapar UVB dengan perlakuan EH-MSCs dosis 200µL secara subkutan) dan kelompok perlakuan 2 (tikus dipapar UVB dengan perlakuan kombinasi EH-MSCs 200µL dan HA 200µL secara subkutan).

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel dilakukan dengan rumus sampel eksperimental dari Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ sehingga didapat hasil 15. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan.¹⁰³

$$\text{Rumus Federer} \quad : (t-1) (n-1) \geq 15$$

$$\text{Sampel tiap Kelompok} \quad : (5-1) (n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus Federer didapatkan jumlah tikus minimal 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu 6 ekor tikus perkelompok.

Keterangan:

t= banyaknya perlakuan

n= banyak sampel setiap perlakuan

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV *light* (broadband dengan *peak emission* pada 302 nm) dengan energi 180 mJ/cm^2 , pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data pot 5 mL, 6 mm *biopsy punch*, sentrifus, mikropipet, 1000 uL mikropipet tip, dan *vial tube* 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain *microplate reader*, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*,

cover glass, dan laptop.

4.4.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan meliputi gel base, ketamin, xylazine, etanol, akuades, dan kloroform sebagai bahan pendukung dalam proses perlakuan dan preparasi sampel. Primer spesifik digunakan untuk gen TNF- α dan primer untuk gen p21 pada analisis ekspresi gen menggunakan metode RT-PCR.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan Nomor dokumen No.23/1/2026/Komisi Bioetik (Lampiran 4).

4.5.2. Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

Prosedur paparan UVB pada model collagen loss selama 14 hari pada tikus Jantan galur wistar dimulai dari tahan adaptasi selama 7 hari di laboratorium hewan coba. Tikus dipelihara dalam kandang dengan suhu 24-26⁰C dan kelembaban terkontrol serta diberikan pakan dan air minum ad libitum. Sebelum diberikan paparan UVB, dilakukan pencukuran bulu pada bagian dorsal (punggung) menggunakan mesin pencukur rambut hewan hingga terbuka area sekitar 4cm² agar sinar UVB dapat langsung mengenai kulit. Tikus kemudian ditempatkan di wadah khusus yang memungkinkan paparan merata, lalu diberikan paparan sinar UVB dengan Panjang gelombang 302nm pada jarak 20cm. Dosis paparan yang diberikan Adalah 180mJ/cm² dalam durasi 10 menit/hari selama 5

kali seminggu (hari 1, 2, 4, 5, dan 7) selama 2 minggu⁸⁷

Tikus Perlakuan 1 adalah tikus sehat tanpa paparan UV-B, Tikus perlakuan 2 adalah tikus yang dipapar UVB kemudian diberi perlakuan secara subkutan menggunakan NaCl 0,9% 200uL, Tikus perlakuan 3 adalah tikus yang dipapar UVB kemudian diberi perlakuan secara subkutan menggunakan *Hyaluronic Acid* (HA) dosis 200uL, Tikus perlakuan 4 adalah tikus yang dipapar UV-B kemudian diberi perlakuan secara subkutan menggunakan EH-MSCs dosis 200uL, Tikus pada Perlakuan 4 diberi perlakuan secara subkutan menggunakan kombinasi EH-MSCs dan HA yang masing-masing diberikan satu kali pada hari 15 hari.

4.5.3. Pengambilan Sampel jaringan

Sebanyak 2x2cm sampel jaringan kulit dorsam subjek penelitian diambil pada hari ke-27 dengan pembiusan menggunakan scalper. Sampel jaringan dimasukkan ke dalam tube berisi RNA letter dan disimpan pada suhu -80°C hingga proses analisis dilakukan.

4.5.4. Validasi Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B

Validasi berkurangnya kolagen akibat paparan UVB dilakukan melalui pengamatan makroskopik menggunakan kamera dan pengamatan mikroskopik menggunakan Masson Trichrome terhadap warna kulit bagian punggung tikus. Perubahan warna kulit diamati setelah dilakukan penyinaran UVB selama 2 minggu. Sampel untuk validasi diambil dari tikus kontrol sehat yang tidak dipapar UVB sebanyak 1 ekor secara acak dan tikus yang sudah dipapar UVB sebanyak 1 ekor secara acak.

4.5.5. Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen TNF- α dan P21 dengan qRT-PCR

Tujuan analisis menentukan perubahan relatif ekspresi mRNA gen pro-inflamasi TNF- α dan gen regulator siklus sel p21 (CDKN1A) antar kelompok perlakuan dengan kuantifikasi yang sensitif, spesifik, dan terstandarisasi.

1. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA

Isolasi RNA total dari sampel dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol® (Invitrogen Life Technologies). Kemurnian dan konsentrasi RNA dievaluasi melalui spektrofotometri (NanoDrop), sedangkan integritas RNA diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa. Sintesis cDNA dilakukan menggunakan iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Catalog No. 1708891) dengan bantuan Reverse Transcriptase PCR Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad).

2. Analisis Ekspresi Gen TNF- α dan ekspresi gen p21

Ekspresi gen TNF- α dan p21 dianalisis menggunakan metode Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR). Reaksi PCR dijalankan menggunakan iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Catalog No. 1725124) dalam tabung PCR 0,2 mL dengan volume total 20 μ L untuk setiap sampel. Amplifikasi dilakukan menggunakan sistem CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) dengan kondisi siklus: pre-denaturasi 95°C selama 3 menit, diikuti 40 siklus denaturasi 95°C selama 10 detik, annealing/ekstensi 60°C selama 30 detik, dan dilanjutkan analisis kurva leleh (melt curve) untuk verifikasi spesifisitas amplifikasi.

3. Normalisasi dan Analisis Data

Gen GAPDH digunakan sebagai gen referensi (housekeeping gene). Data diekspresikan dalam bentuk fold change relatif dengan metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Analisis dilakukan pada tiga kali ulangan teknis dan minimal tiga ulangan biologis. Hasil dievaluasi secara statistik menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

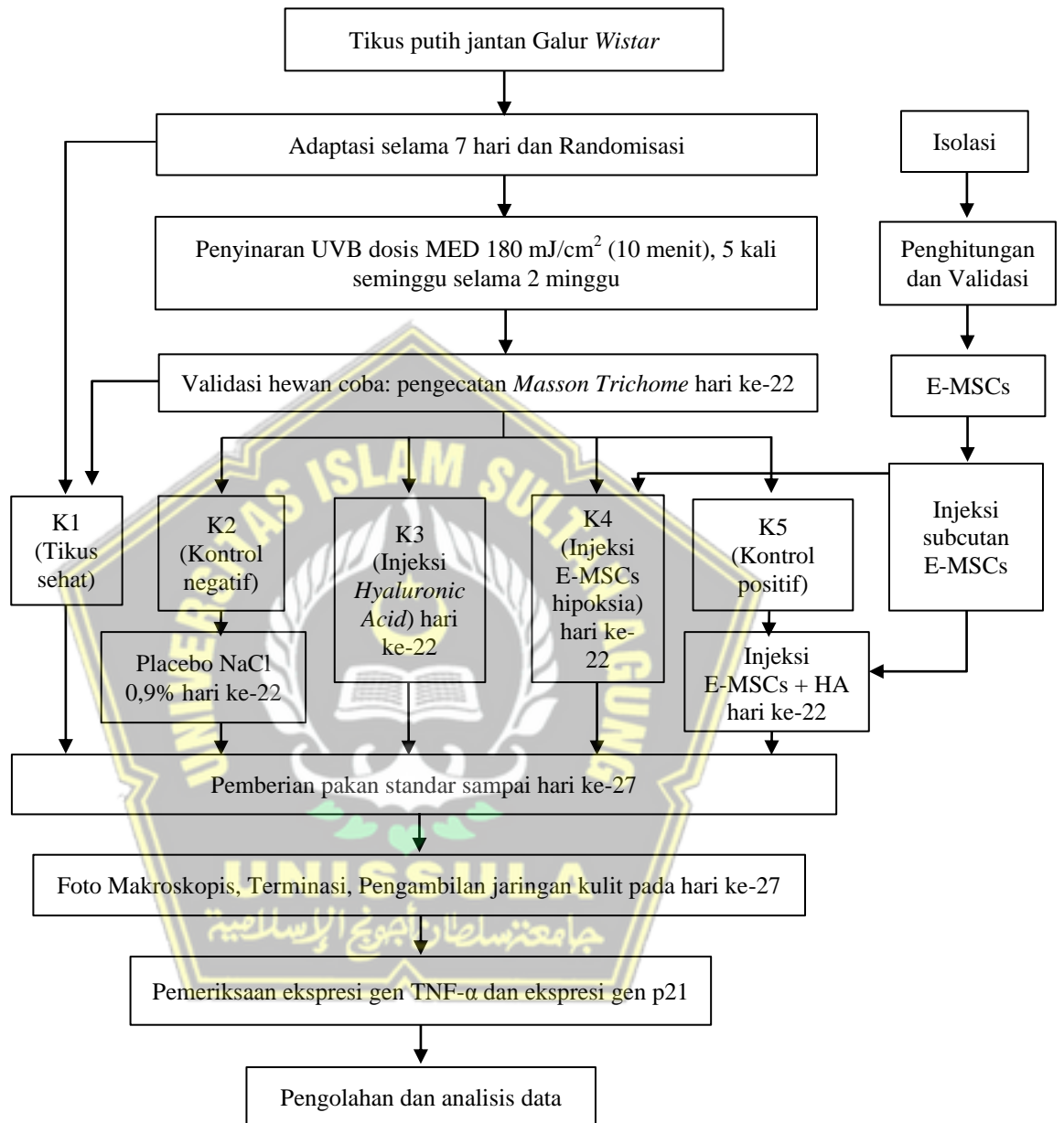
Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research*, Jawa Tengah pada Oktober-Desember 2025. (Lampiran.3)

4.7. Analisis Data

Data ekspresi gen TNF- α dan p21 diuji normalitas distribusi data menggunakan *Shapiro-Wilk test*, sedangkan uji homogenitas varian data dengan *Levene's test*. Data ekspresi gen TNF- α terdistribusi tidak normal ($p < 0,05$) dan varian data tidak homogen ($p < 0,05$), maka analisis perbedaan antar kelompok menggunakan uji *non-parametrik Kruskal-Wallis* untuk menilai perbedaan antar kelompok, dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* sebagai analisis lanjutan antar kelompok.

Data ekspresi gen p21 menunjukkan distribusi normal ($p > 0,05$) dan varian tidak homogen ($p < 0,05$), sehingga digunakan setelah uji One Way Anova dan dilanjutkan dengan uji Tamhane. Analisis data menggunakan perangkat lunak SPSS versi 26.0 for Windows, dengan tingkat kemaknaan ditetapkan pada $p < 0,05$.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

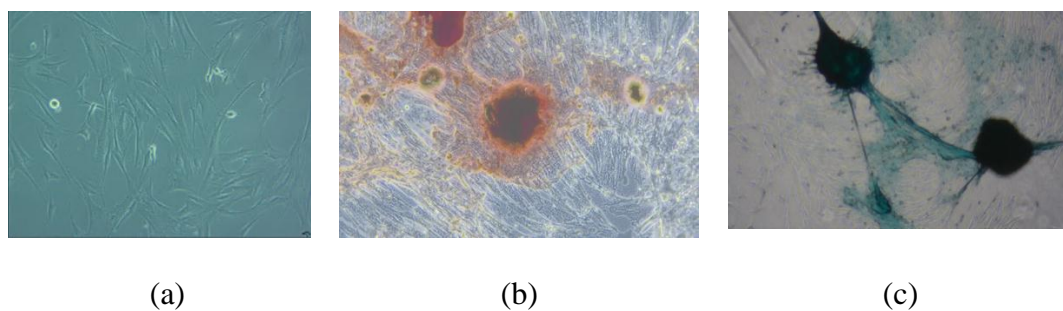
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

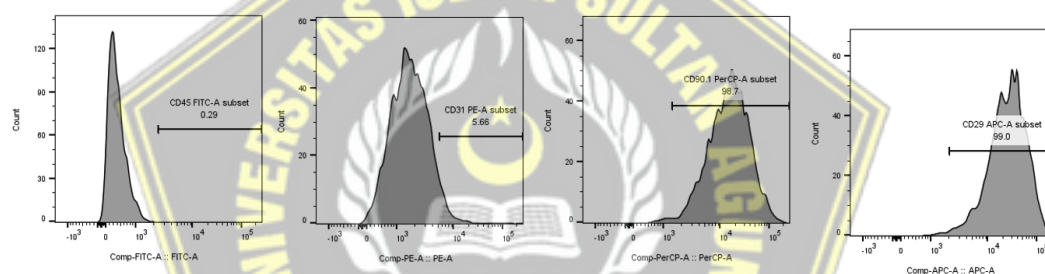
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tentang pengaruh pemberian kombinasi *exosome hypoxia* MSCs (EH-MSCs) dan *Hyaluronic Acid* (HA) terhadap ekspresi gen TNF- α dan p21 menggunakan tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan paparan UVB. Keseluruhan 30 ekor tikus yang digunakan berhasil melalui seluruh rangkaian penelitian mulai dari tahap adaptasi sampai terminasi, tidak ada tikus yang mati sehingga tidak ada yang mengalami *drop out*.

5.1.1. Hasil Validasi *Exosome MSCs hypoxia*

Exosome hypoxia Mesencymal Stem Cells (EH-MSCs) diisolasi dari kultur sel yang sudah mencapai 80% konfluen dengan karakteristik berbentuk *spindle-like cell* dan melekat pada dasar flask tempat kultur (Gambar 5.1a). Validasi EH-MSCs menggunakan uji kemampuan deferensiasi sel menjadi sel matur dan karakterisasi penanda permukaan. Hasil pengamatan deferensiasi sel dengan pewarnaan *Osteogenic Alizarin-red* menunjukkan bahwa MSCs mampu berdiferensiasi menjadi ostiosit yang diindikasikan oleh endapan kalsium berupa penampakan merah (Gambar 5.1b). Hasil uji deferensiasi dengan pewarnaan *Chondrocyte Alician Blue* menunjukkan warna biru sebagai penanda senyawa proteoglikan yang mencirikan diferensiasi sel menjadi chondrocyte (Gambar 5.1c)



Gambar 5.1. Hasil pengamatan mikroskopis (a) Bentuk *spindle-like cell* EH- MSCs (Perbesaran 40×), (b) Hasil diferensiasi MSCs menjadi osteosit (pewarnaan Osteogenic Alizarin-red, perbesaran 200×), (c) MSCs berdiferensiasi menjadi chondrocyte (pewarnaan Chondrocyte Alician Blue, perbesaran 100×)

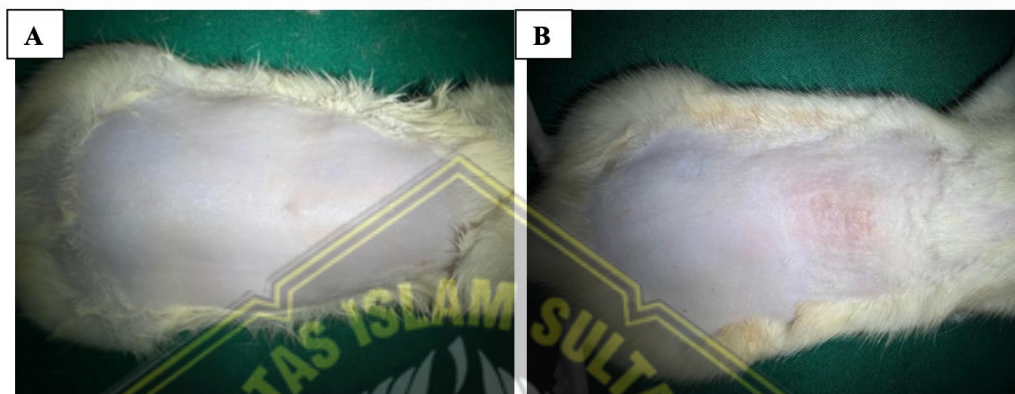


Gambar 5.2. Menunjukkan hasil *flow cytometry* kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai marker permukaan yang ditandai dengan persentase ekspresi positif CD90.1 sebesar 98,7%, CD29 sebesar 99,0% dan ekspresi negative dari CD45 sebesar 0.29% dan CD31 sebesar 5,66%.

5.1.2. Hasil Validasi *Collagen Loss* Pada Tikus yang Dipapar UVB

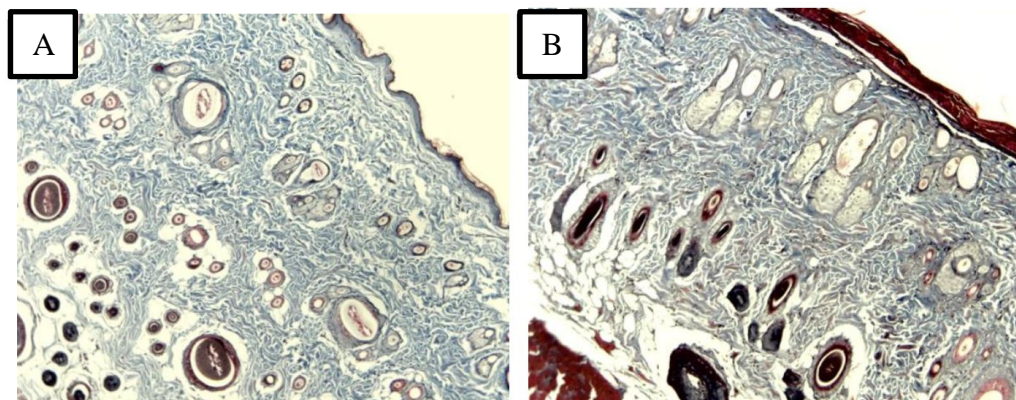
Model *collagen loss* tikus dikembangkan dengan paparan UVB pada jarak 20 cm dengan Panjang gelombang 302nm dengan kekuatan 150mj/cm². Durasi paparan selama 8 menit dengan frekuensi 10 kali dalam 14 hari untuk membuat tikus model *collagen loss*. Hasil pengamatan makroskopis secara visual (Gambar5.3) menunjukkan bahwa pada tikus sehat yang tidak dipapar UVB menunjukkan permukaan kulit tampak utuh, halus dan homogen. Ketebalan kulit

dalam batas normal tanpa penonjolan, warna kulit merata tanpa ada eritema, diskolorasi atau lesi fokal. Permukaan kulit tikus yang dipapar UVB menunjukkan tampak kurang homogen, terdapat penebalan jaringan pada kulit, terlihat perubahan warna lokal berupa area kemerahan (eritema ringan).



Gambar 5.3. Gambaran makroskopis pengamatan secara visual menggunakan kamera handphone pada tikus (a) sehat (tidak dipapar UVB) dan (b) dipapar UVB

Hasil validasi model *collagen loss* akibat paparan UVB secara mikroskopis menggunakan pewarnaan *Masson Trichome*. menunjukkan terjadi penurunan densitas *collagen* setelah paparan UVB (Gambar 5.4). Pada tikus sehat epidermis tampak dengan ketebalan normal. Dermis berisi serabut *collagen* padat, tebal, dan terorganisasi baik, berwarna biru intens. Distribusi *collagen* merata, tanpa fragmentasi, struktur adneksa kulit tampak normal. Epidermi tikus yang dipapar UVB es tampak menebal (akantosis), ermis tampak menebal, namun disertai penurunan intensitas warna biru *collagen*, serabut *collagen* lebih tipis, terfragmentasi dan tidak teratur. Collagen loss juga ditandai dengan pelebaran ruang stroma dermis dan terjadi disorganisasi matriks ekstraseluler di sekitar struktur adneksa (Gambar 5.5).



Gambar 5.4. Gambaran mikroskopis pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pada tikus (a) sehat (tidak dipapar UVB) dan (b) dipapar UVB

5.1.3. Efek Pemberian *Exosome MSC hypoxia* dan *Hyaluronic Acid* Terhadap ekspresi gen TNF- α

Tabel 5.1 menunjukkan rerata dan standard deviasi dari ekspresi TNF- α pada berbagai kelompok perlakuan. Hasil uji normalitas dengan Shapiro Wilk menunjukkan bahwa distribusi data ekspresi TNF- α tidak normal yaitu terdapat minimal 1 kelompok dengan nilai ($p > 0.05$) pada K5 diperoleh $p = 0.033$. Hasil uji homogenitas varian data diperoleh $p = 0.000$ ($p > 0.05$) sehingga varian data ekspresi TNF- α adalah homogen. Oleh karena itu, uji beda antar kelompok dapat menggunakan uji non parametrik Kruskal wallis dan diperoleh $p = 0.000$ ($p < 0.05$) yang berarti bahwa minimal terdapat 1 pasang kelompok perlakuan dengan ekspresi TNF- α yang berbeda signifikan. Hasil uji lanjut dengan Mann Whitney (Tabel 5.2) diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara rerata ekspresi TNF- α pada kelompok K1 dan K2 dengan nilai $p = 0.004$ ($p < 0.05$), K1 dan K3 dengan nilai $p = 0.004$ ($p < 0.05$), K1 dan K4 dengan nilai $p = 0.023$ ($p < 0.05$), K2 dan K5 dengan nilai $p = 0.004$ ($p < 0.05$), K3 dan K5 dengan nilai $p = 0.004$ ($p < 0.05$), dan K4 dan K5 dengan nilai $p = 0.012$ ($p < 0.05$). Data ekspresi

TNF- α pada tabel 5.1 menunjukkan hasil analisa data pengaruh ekspresi gen TNF- α pada berbagai kelompok perlakuan. Keberhasilan induksi *collagen loss* akibat paparan UVB pada penelitian ini dapat dilihat berdasarkan rerata ekspresi gen TNF- α pada kelompok K2 (UVB dan injeksi s.c 200 μ l NaCl 0.9% yaitu sebesar 0.195 ± 0.455 yang lebih tinggi secara signifikan ($p < 0.05$) dibandingkan dengan K1 (kelompok sehat) yaitu sebesar 0.073 ± 0.008 . Injeksi s.c 200 uL *Hyaluronic Acid* (HA) pada kelompok tikus K3, dan 200 uL EH-MSCs (K4) menunjukkan efek penurunan ekspresi TNF- α jika dibandingkan dengan K2. Ekspresi TNF- α sebesar 0.068 ± 0.116 pada kelompok tikus yang dipapar UVB dan diberi kombinasi HA dan EH-MSCs (K5) lebih rendah dan berbeda secara signifikan dibandingkan dengan terapi tunggal HA (K3) sebesar 0.168 ± 0.061 dan terapi tunggal EH-MSCs (K4) yaitu sebesar 0.135 ± 0.546 . Rerata ekspresi TNF- α pada kelompok tikus yang diberi kombinasi EH-MSCs dan HA tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (K1).

Tabel 5.1. Rerata serta nilai signifikansi dari Uji Normalitas, Homogenitas dan *One Way Anova* kadar ekspresi gen TNF- α

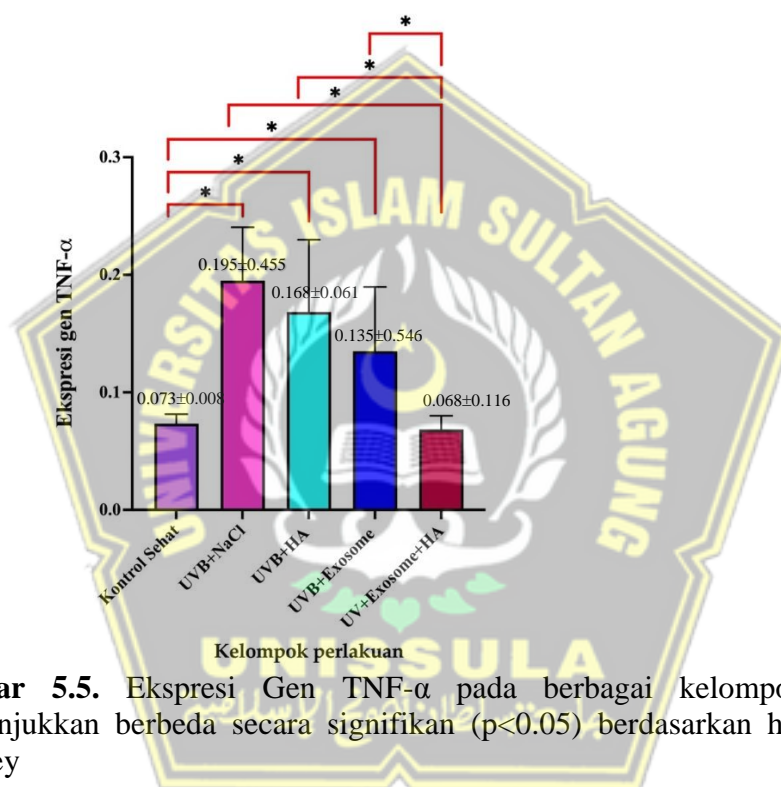
Kelompok Perlakuan	Rerata \pm SD	nilai p pada hasil uji		
		<i>Shapiro Wilk</i>	<i>Levene Test</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
K1 (Kontrol sehat)	0.073 ± 0.008	0.091		
K2 (UVB+NaCl)	0.195 ± 0.455	0.629		
K3 (UVB+HA)	0.168 ± 0.061	0.476	0.000	0.000
K4 (UVB+EH-MSCs)	0.135 ± 0.546	0.293		
K5 (UVB + HA+ EH-MSCs)	0.068 ± 0.116	0.033		

Keterangan: *menunjukkan berbeda secara signifikan ($p < 0.05$)

Tabel 5.2. Nilai signifikasni hasil uji Mann Whitney yang menunjukkan perbedaan eskpresi gen TNF- α antar kelompok perlakuan

Kelompok Perlakuan	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0.004*	0.004*	0.023*	0.277
K2	0.004*		0.469	0.065	0.004*
K3	0.004*	0.469		0.226	0.004*
K4	0.023*	0.065	0.226		0.012*
K5	0.277	0.004*	0.004*	0.012*	

Keterangan: *menunjukkan berbeda secara signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.5. Ekspresi Gen TNF- α pada berbagai kelompok perlakuan. *menunjukkan berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) berdasarkan hasil uji Mann Whitney

5.1.4. Efek Pemberian *Exosome* MSC *hypoxia* dan *Hyaluronic Acid*

Terhadap ekspresi gen P21

Tabel 5.3 menunjukkan rerata dan standard deviasi dari ekspresi P21 pada berbagai kelompok perlakuan. Hasil uji nomralitas dengan Shapiro Wilk menunjukkan bahwa distribusi data ekspresi P21 pada semua kelompok adalah normal ($p > 0.05$). Hasil uji homogenitas varian data diperoleh $p = 0.018$ ($p < 0.05$) sehingga varian data ekspresi P21 adalah tidak homogen. Oleh karena itu, uji beda

antar kelompok dapat menggunakan uji parametrik One Way Anova dan diperoleh $p=0.000$ ($p<0.05$) yang berarti bahwa minimal terdapat 1 pasang kelompok perlakuan dengan ekspresi P21 yang berbeda signifikan. Hasil uji Post Hoc Tamhane (Tabel 5.4 menunjukkan bahwa pasangan kelompok perlakuan yang memiliki rerata ekspresi gen p21 berbeda bermakna ($p<0,05$) adalah K1 dan K2 dengan nilai $p=0.001$ ($p<0,05$), K1 dan K3 dengan nilai $p=0.000$ ($p<0,05$), K1 dan K4 dengan nilai $p=0.000$ ($p<0,05$), K1 dan K5 dengan nilai $p=0.003$ ($p<0,05$), K2 dan K5 dengan nilai $p=0.014$ ($p<0,05$), K3 dan K5 dengan nilai $p=0.014$ ($p<0,05$), sedangkan K2 dan K3 dengan nilai $p=0.0841$ ($p>0,05$), K2 dan K4 dengan nilai $p=0.546$ ($p>0,05$), K3 dan K4 dengan nilai $p=0.656$ ($p>0,05$), K4 dan K5 dengan nilai $p=1.000$ ($p>0,05$) menunjukkan hasil tidak berbeda bermakna.

Keberhasilan induksi *collagen loss* akibat paparan UVB pada penelitian ini dapat dilihat berdasarkan rerata ekspresi gen P21 pada kelompok K2 (UVB dan injeksi s.c 200 μ l NaCl 0.9% yaitu sebesar 0.380 ± 0.817 yang lebih tinggi secara signifikan ($p<0.05$) dibandingkan dengan K1 (kelompok sehat) yaitu sebesar 0.085 ± 0.308 . Injeksi s.c 200 μ L *Hyaluronic Acid* (HA) pada kelompok tikus K3, dan 200 μ L EH-MSCs (K4) menunjukkan efek penurunan ekspresi P21 jika dibandingkan dengan K2. Ekspresi P21 sebesar 0.191 ± 0.306 pada kelompok tikus yang dipapar UVB dan diberi kombinasi HA dan EH-MSCs (K5) lebih rendah dan berbeda secara signifikan dibandingkan dengan terapi tunggal HA (K3) sebesar 0.318 ± 0.591 dan terapi tunggal EH-MSCs (K4) yaitu sebesar 0.305 ± 0.258 . Rerata ekspresi P21 pada kelompok tikus yang diberi kombinasi EH-MSCs dan HA menunjukkan perbedaan ($p>0.05$) jika dibandingkan dengan kelompok kelompok

K2 (UVB dan dinjeksi s.c 200 µl NaCl 0.9%) yaitu mengalami penurunan ekspresi P21.

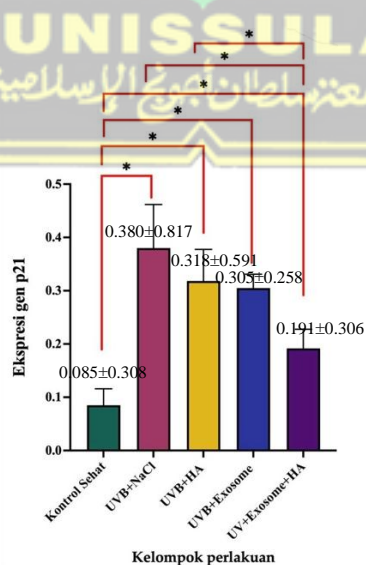
Tabel 5.3. Rerata serta nilai signifikansi dari Uji Normalitas, Homogenitas dan *One Way Anova* kadar ekspresi gen P21

Kelompok Perlakuan	Rerata ±SD	nilai <i>p</i> pada hasil uji		
		<i>Shapiro Wilk</i>	<i>Levene Test</i>	<i>One Way Anova</i>
K1 (Kontrol sehat)	0.085±0.308	0.755		
K2 (UVB+NaCl)	0.380±0.817	0.268		
K3 (UVB+HA)	0.318±0.591	0.991	0.018	0.000
K4 (UVB+EH-MSCs)	0.305±0.258	0.272		
K5 (UVB + HA+ EH- MSCs)	0.191±0.306	0.80		

Keterangan: *menunjukkan berbeda secara signifikan ($p < 0.05$)

Tabel 5.4. Nilai signifikansi hasil uji *Post Hoc Tamhane* yang menunjukkan perbedaan ekspresi gen P21 antar kelompok perlakuan

Kelompok Perlakuan	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0.001*	0.000*	0.000*	0.003*
K2	0.000*		0.841	0.546	0.000*
K3	0.000*	0.047*		0.656	0.014*
K4	0.000*	0.018*	0.656		1.000
K5	0.001*	0.000*	0.000*	0.001*	



Gambar 5.6. Rerata ekspresi gen p21 pada berbagai kelompok perlakuan

5.2. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian kombinasi *exosome hypoxia* MSCs dan HA terhadap ekspresi gen TNF- α dan ekspresi gen p21 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi dengan paparan UV-B secara berulang selama 2 minggu yang ditunjukkan berdasarkan Gambaran makroskopis dengan kamera serta mikroskopis dengan pewarnaan Masson Tricome. Validasi model menunjukkan bahwa paparan UVB menimbulkan perubahan makroskopis berupa kulit tampak lebih kusam, kering, dan berkerut, disertai perubahan mikroskopis berupa penurunan kerapatan kolagen dermal, disorganisasi serabut, dan pelebaran ruang antar serabut yang konsisten dengan *collagen loss*. Secara molekuler, kelompok K2 (UVB dengan NaCL) mengalami peningkatan bermakna ekspresi gen TNF- α dan p21 dibandingkan kontrol sehat (K1). Peningkatan TNF- α merefleksikan aktivasi inflamasi akibat stres oksidatif dan kerusakan DNA yang kemudian menginduksi p21 melalui jalur p53, memicu penghentian siklus sel dan senesens; keduanya berkontribusi pada degradasi kolagen dan penurunan kapasitas regeneratif jaringan.⁷⁰⁻⁷⁴ Studi hewan menunjukkan kelompok UVB memiliki penurunan bermakna kandungan kolagen dibanding kontrol, dengan gambaran histologi kolagen yang terdegradasi dan tidak teratur.⁷⁵ Paparan UVB memicu kerusakan DNA kulit, meningkatkan produksi ROS, menyebabkan stress oksidatif dan merangsang kehilangan kolagen yang menyebabkan penuaan kulit dini.⁶⁷ Kerusakan akibat UVB ini ditopang oleh dua pilar patologis utama yaitu peradangan kronis (*inflammaging*) dan penuaan seluler (*cellular senescence*).

Stres oksidatif juga mengaktifkan jalur *Nuclear Factor-kappa B* (NF- κ B), sebuah faktor transkripsi master yang mengatur ekspresi berbagai sitokin pro-inflamasi.^{2,7} Salah satu sitokin kunci dalam proses ini adalah Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α), yang tidak hanya memperkuat respons inflamasi tetapi juga berkontribusi lebih lanjut pada degradasi ECM dan apoptosis fibroblas, yang kemudian menciptakan siklus kerusakan yang berkelanjutan.^{10,11} UVB memicu keratinosit dan fibroblas dermis mengekspresikan TNF- α secara cepat dan kuat, baik pada kulit manusia *in vivo* maupun *in vitro*.⁷⁶⁻⁷⁹ Kerusakan DNA akibat UVB juga mengaktifkan jalur supresor tumor p53, yang menginduksi ekspresi gen p21 (CDKN1A) yang merupakan inhibitor kuat *cyclin-dependent kinase* (CDK).^{12,13} Peningkatan ekspresi p21 memicu penghentian siklus sel yang ireversibel, suatu kondisi yang dikenal sebagai *cellular senescence*.^{13,14} Akumulasi sel-sel senescent ini merupakan pendorong fundamental fenotipe penuaan, sebagian karena kemampuannya mensekresikan faktor-faktor pro-inflamasi dan degradatif.^{12,15} Beberapa intervensi anti-photoaging (ekstrak tanaman, peptida kolagen, inhibitor HDAC) memperbaiki kolagen sekaligus menormalkan atau menurunkan ekspresi p21 dan marker senesens yang diinduksi UVB.⁸⁰

Pada kelompok K3 (UVB + HA), menunjukkan ekspresi TNF- α dan p21 pada K3 menurun dibanding K2, mengindikasikan bahwa HA memberikan efek protektif terhadap inflamasi dan senesens yang dipicu UVB. Mekanisme perbaikan HA dalam collagen loss kemungkinan melalui peningkatan hidrasi dan stabilitas matriks ekstraseluler, yang memperbaiki organisasi fibril kolagen dan ketahanan terhadap stres mekanik.⁸¹⁻⁸⁴ Kondisi ini, bersama sifat antioksidan dan

anti- inflamasi HMW- HA, menurunkan ROS dan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α .⁸⁵⁻⁸⁹ Penurunan stres oksidatif dan inflamasi tersebut berpotensi mengurangi kerusakan DNA dan aktivasi jalur p53–p21 yang berkontribusi pada senesens sel dermal.^{86,88} Hasil penelitian ini sejalan dengan Zaccaron et al (2022) yang telah meneliti tikus Wistar dengan luka epitel yang diberi gel HA 0,9% topikal menunjukkan penurunan TNF- α , IL-6, IL-1 β dan peningkatan IL-4/IL-10 serta TGF- β ; juga terjadi penurunan marker stres oksidatif dan perbaikan kontraksi luka.⁹⁰

Pada kelompok perlakuan EH- MSCs tunggal (K4), perbaikan *collagen loss* lebih tinggi dibanding K2 (kontrol negatif/UVB da NaCl) dan secara kualitatif dapat mendekati atau bahkan melampaui K3 (UVB dan HA). Secara molekuler, injeksi EH-MSCs menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α yang lebih besar dibanding injeksi HA, yang sejalan dengan fungsi exosome MSC sebagai pembawa berbagai miRNA, protein, dan faktor parakrin yang menekan jalur NF- κ B dan produksi sitokin proinflamasi. Eksosom MSC mengurangi ROS, β - gal senesens, dan fokus kerusakan DNA, menormalkan jalur SIRT1–p53–p21 dan mempertahankan proliferasi fibroblas (Matsuoka et al., 2021). Ekspresi p21 pada K4 menurun dibanding K2, yang menunjukkan bahwa exosome hypoxia MSC tidak hanya meredam inflamasi, tetapi juga memodulasi respons kerusakan DNA dan senesens seluler, memungkinkan berlanjutnya proliferasi dan regenerasi fibroblas/keratinosit sehingga perbaikan kolagen berlangsung lebih efektif. Eksosom MSC untuk penyembuhan luka kulit meningkatkan proliferasi dan migrasi keratinosit/fibroblas dan mempercepat re-epitelisasi serta

angiogenesis.⁹¹⁻⁹³ Hipoksia pra-kondisi MSC meningkatkan muatan miRNA pro-regeneratif (mis. miR-125b, miR-216a-5p) dan memperkuat efek anti-oksidatif/anti-inflamasi.⁹³⁻⁹⁵

Kelompok kombinasi exosome hypoxia MSCs + HA (K5) menunjukkan perbaikan paling optimal. Secara kuantitatif, ekspresi TNF- α pada K5 merupakan yang terendah di antara kelompok terpapar UVB, bahkan dapat mendekati nilai kontrol sehat K1, menandakan penekanan inflamasi yang sangat efektif melalui sinergi efek antiinflamasi exosome dan perbaikan lingkungan matriks oleh HA. Ekspresi p21 pada injeksi kombinasi EH-MSCs dan HA (K5) menurun paling besar dibanding K2 (UVB+NaCl), K3 (UVB+HA), dan K4 (UVB+EH-MSCs), menunjukkan bahwa kombinasi terapi ini paling efektif menetralkan dampak kerusakan DNA dan mengurangi senesens seluler. Dibandingkan perlakuan tunggal, K5 menggabungkan dua mekanisme: (1) modulasi jalur inflamasi dan regeneratif oleh EH- MSCs, dan (2) optimalisasi matriks dan retensi faktor bioaktif oleh HA, sehingga keduanya memberikan efek komplementer pada penurunan TNF- α dan p21 sekaligus perbaikan struktur kolagen. EH-MSC (termasuk yang diprekondisi hipoksia) membawa miRNA/protein yang menekan jalur NF- κ B dan menurunkan TNF- α , IL-1 β , IL-6, MMP-1/3/9, serta ROS pada model kulit, sendi, dan tulang.⁹⁶⁻⁹⁹ Pada fibroblas kulit menua, kombinasi eksosom HucMSC dengan kolagen oligopeptida menurunkan TNF- α dan marker senesens p21/p16/p53 paling kuat dibanding masing-masing tunggal, sambil meningkatkan kolagen I/III.⁹⁶ Beberapa sistem hidrogel HA yang memuat eksosom MSC menunjukkan retensi lokal eksosom yang lebih lama, pelepasan

bertahap, pengurangan inflamasi, dan regenerasi jaringan yang lebih baik (luka kronis, tulang, tulang kranial) dibanding pemberian eksosom bebas.^{10⁰⁻¹⁰²} Ini mendukung klaim penurunan TNF- α dan p21 oleh komponen eksosom.

Penelitian ini juga menemukan bahwa kombinasi injeksi *EH-MSC* dosis 2.5×10^5 sel dalam 200 μ L NaCl 0.9% dan HA dosis 200 μ L secara subcutan secara significant mampu menurunkan ekspresi gen TNF- α dan ekspresi gen p21 dibandingkan dengan injeksi HA dosis 200 μ L maupun injeksi *EH-MSC hypoxia* dosis 2.5×10^5 sel dalam 200 μ L NaCl dosis tunggal. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi injeksi *Exosome MSC hypoxia* dan *Hyaluronic Acid* secara subcutan memiliki aktivitas anti-apoptosis, agen anti inflamasi dan anti oksidan yang lebih efektif pada kulit yang dipapar UVB.

5.3. Keterbatasan penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan diantaranya adalah ukuran sampel dan durasi paparan serta terapi belum mencerminkan kondisi klinis kronis pada manusia, sehingga generalisasi hasil ke konteks klinis harus dilakukan hati-hati. Di samping itu, tidak dilakukan perbandingan dengan dosis atau jenis HA yang berbeda, sehingga efek dosis-respon belum tergambar.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat perbedaan ekspresi gen TNF- α pada kelompok perlakuan kombinasi *exosome hypoxia* MSCs dan *Hyaluronic Acid* (HA), dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tunggal.
2. Terdapat perbedaan ekspresi gen p21 pada kelompok perlakuan kombinasi EH-MSCs dan HA, dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tunggal.
3. Terdapat perbedaan efektivitas antara kelompok perlakuan kombinasi dengan kelompok tunggal EH-MSCs, dan kelompok Tunggal HA sehingga kombinasi EH-MSCs dan HA dapat memberikan efek sinergis terhadap penurunan ekspresi gen TNF- α dan P21.

6.2. Saran

Penelitian selanjutnya diperlukan paparan dan terapi jangka panjang yang lebih mendekati kondisi klinis kronis pada manusia, sehingga relevansi translasional lebih kuat. Selain itu, penelitian berikutnya perlu membandingkan beberapa dosis dan formulasi/jenis HA untuk menggambarkan hubungan dosis-respon dan menentukan dosis optimal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Widiyanto B, Yuniarifa C, Purnamasari R. Efek Perlindungan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria Ternatea L.*) Terhadap Densitas Kolagen dari Paparan Sinar UVB. *Jurnal Sehat Indonesia (JUSINDO)* 2023;6(01):175–182.
2. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):1–5.
3. Yosef R, Pilpel N, Papismadov N, et al. p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J* 2017;36(15):2280–2295.
4. Yan J, Chen S, Yi Z, et al. The role of p21 in cellular senescence and aging-related diseases. *Mol Cells* 2024;47(11):100113.
5. Wu J, Lin F, Chen B. Daphnoretin inhibited SCI-induced inflammation and activation of NF- κ B pathway in spinal dorsal horn. *Aging* 2024;16(11):9680–9691.
6. Krutmann J, Bouloc A, Sore G, Bernard BA, Passeron T. The skin aging exposome. *J Dermatol Sci* 2017;85(3):152–161.
7. Chaudhary M, Khan A, Gupta M. Skin Ageing: Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. *Curr Aging Sci* 2020;13(1):22–30.
8. Mochel K, Bronte J, Kasaba M, Vempati A, Tam C, Hazany S. The Impact of Psychological Stress on Wound Healing: Implications for Neocollagenesis and Scar Treatment Efficacy. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2025;18:1625–1637.
9. Rizky DA, Fajarini H, Balfas RF. Gambaran Pengetahuan Tentang Sunscreen Pada Remaja di Desa Bulusari. *Jurnal Ilmiah Jophus: Journal of Pharmacy UMUS* 2024;6(1):27–36.
10. Wikassa T, Damayanti D, Irwadi I, et al. Skin Aging Profile in Tertiary Hospital: a Descriptive Study. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin* 2022;34(1):36–45.
11. Gao W, Yuan L, Zhang Y, et al. miR-1246-overexpressing exosomes suppress UVB-induced photoaging via regulation of TGF- β /Smad and attenuation of MAPK/AP-1 pathway. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2022;22(1):135–146.
12. Huynh CB, Vu NB, Van TT, Pham P Van. Effects of Exosomes From Hypoxia-Induced Adipose-Derived Stem Cells on Ameliorating

Photoaging. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2025;18:1683–1702.

13. Angelina J, Putra A, Trisnadi S, et al. Hypoxia-conditioned mesenchymal stem cells (MSC) exosomes attenuate ultraviolet-B (UVB)-mediated malondialdehyde (MDA) and matrix metalloproteinase-1 (MMP)-1 upregulation in collagen loss models. *Med Glas* 2025;22(1):9–14.
14. Mustofa H. Pengaruh Pemberian MSCs-Exosome Hipoksia terhadap Ekspresi Gen IL-1 β dan Caspase 1 (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Wistar Jantan dengan Penurunan Kolagen Akibat Irradiasi Sinar UVB). Semarang: Universitas Islam Sultan Agung 2024;
15. Sari I. Pengaruh Pemberian Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell terhadap Ekspresi MIP-1 α dan CD68 (Studi Eksperimental In Vivo Pada Mencit C57BL Hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB). Semarang: Universitas Islam Sultan Agung 2024;
16. Shin J-W, Kwon S-H, Choi J-Y, et al. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int J Mol Sci* 2019;20(9).
17. Liu H, Dong J, Du R, Gao Y, Zhao P. Collagen study advances for photoaging skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2024;40(1):e12931.
18. Baroni A, Buommino E, Gregorio V De, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 2012;30(3):257–62.
19. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol* 2012;4(3):308–19.
20. Varani J, Dame MK, Rittie L, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol* 2006;168(6):1861–8.
21. Hwang J, Huang Y, Burwell TJ, et al. In Situ Imaging of Tissue Remodeling with Collagen Hybridizing Peptides. *ACS Nano* 2017;11(10):9825–9835.
22. Ko YM, Kim TH. The Role of Ginsenoside Rg3 in Modulating Oxidative Stress, Apoptosis, and Angiogenesis: Implications for Skincare and Anticancer Therapies. *BIOCELL* 2025;49(7):1141–1168.
23. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S -i., Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010;49(7):1215–1228.

24. Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010;20(2):87–103.
25. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000;50(3):184–95.
26. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10(1):45–65.
27. Jang D, Lee A-H, Shin H-Y, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2021;22(5):2719.
28. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118(2):503–8.
29. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002;14(6):477–92.
30. Moatti A, Cohen JL. The TNF- α /TNFR2 Pathway: Targeting a Brake to Release the Anti-tumor Immune Response. *Front Cell Dev Biol* 2021;9.
31. RITTIE L. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 2002;1(4):705–720.
32. Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev* 2015;21:16–29.
33. Chung HY, Kim DH, Lee EK, et al. Redefining Chronic Inflammation in Aging and Age-Related Diseases: Proposal of the Senoinflammation Concept. *Aging Dis* 2019;10(2):367–382.
34. Parveen A, Akash MSH, Rehman K, Kyunn WW. Dual Role of p21 in the Progression of Cancer and Its Treatment. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2016;26(1):49–62.
35. Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res* 2010;704(1–3):12–20.
36. Lai L, Shin GY, Qiu H. The Role of Cell Cycle Regulators in Cell Survival—Dual Functions of Cyclin-Dependent Kinase 20 and p21Cip1/Waf1. *Int J Mol Sci* 2020;21(22):8504.
37. Pack LR, Daigh LH, Chung M, Meyer T. Clinical CDK4/6 inhibitors induce selective and immediate dissociation of p21 from cyclin D-CDK4 to inhibit CDK2. *Nat Commun* 2021;12(1):3356.
38. Passos JF, Zglinicki T von, Saretzki G. Mitochondrial dysfunction and cell

senescence: cause or consequence? *Rejuvenation Res* 2006;9(1):64–8.

39. Matthaiei M, Meng H, Meeker AK, Eberhart CG, Jun AS. Endothelial Cdkn1a (p21) overexpression and accelerated senescence in a mouse model of Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(10):6718–27.
40. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(7):482–496.
41. Dominici M, Blanc K Le, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315–317.
42. Karlova M, Abramochkin D V., Pustovit KB, et al. Disruption of a Conservative Motif in the C-Terminal Loop of the KCNQ1 Channel Causes LQT Syndrome. *Int J Mol Sci* 2022;23(14):7953.
43. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2019;76(17):3323–3348.
44. Niel G van, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19(4):213–228.
45. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* (1979) 2020;367(6478).
46. Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine* 2020;15:6917–6934.
47. Dukharan V, Shah M, Broughton L, et al. The Role of Exosomes in Medical Dermatology: Literature Review and Update. *J Cosmet Dermatol* 2025;24(1):e16761.
48. Park AY, Lee JO, Jang Y, et al. Exosomes derived from human dermal fibroblasts protect against UVB-induced skin photoaging. *Int J Mol Med* 2023;52(6).
49. Nguyen ST. Exosomes derived from mesenchymal stem cells: A novel agent for skin aging treatment. *Biomedical Research and Therapy* 2024;11(12):7003–7014.
50. Jeyaram A, Jay SM. Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications. *AAPS J* 2018;20(1):1.
51. Li S, Zhang J, Sun L, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular

- vesicles: current advances in preparation and therapeutic applications for neurological disorders. *Front Cell Dev Biol* 2025;13:1626996.
52. Sicard F, Toro-Mendoza J, Striolo A. Nanoparticles Actively Fragment Armored Droplets. *ACS Nano* 2019;13(8):9498–9503.
 53. Ziegler-Rodriguez G, Garces-Ruiz M, La Cruz-Ku G De, et al. Prepectoral and Retropectoral Breast-implant–Associated Anaplastic Large-cell Lymphoma. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2024;12(1):e5520.
 54. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2009;14(1):20–24.
 55. Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells* 2015;33(6):1818–28.
 56. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997;242(1):27–33.
 57. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med (Praha)* 2008;53(8):397–411.
 58. Ke C, Sun L, Qiao D, Wang D, Zeng X. Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid. *Food Chem Toxicol* 2011;49(10):2670–5.
 59. Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int J Biol Macromol* 2018;120:1682–1695.
 60. Sudha PN, Rose MH. Beneficial Effects of Hyaluronic Acid. 2014; p. 137–176.
 61. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol* 2012;4(3):253–258.
 62. Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation- induced matrix degradation – a review. *Int J Cosmet Sci* 2005;27(1):17–34.
 63. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)* 2018;10(7):701.
 64. Darlan DM, Munir D, Putra A, Jusuf NK. MSCs-released TGFβ1 generate

- CD4+CD25+Foxp3+ in T-reg cells of human SLE PBMC. *Journal of the Formosan Medical Association* [homepage on the Internet] 2021;120(1):602–608. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.06.028>
65. Sungkar T, Putra A, Lindarto D, Sembiring RJ. Intravenous Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation Regulates Hyaluronic Acid and Interleukin-10 Secretion Producing Low-grade Liver Fibrosis in Experimental Rat. *Med Arch* 2020;74(3):177–182.
 66. Labarrade F, Botto JM, Imbert IM. miR-203 respesses keratinocyte stemness by targeting surviving. *J Cosmet Dermatol*. 2022;21(11);6100-8
 67. Xu W, Che Y, Zhang Q, Huang H, Ding C, Wang Y, et al. Apaf-1 Pyroptosome Senses Mitochondrial Permeability Transition. *Cell Metab*. 2021;33(2):424-436.e10.
 68. Hu JC, Zheng CX, Sui BD, Liu WJ, Jin Y. Mesenchymal stem cell-derived exosome: A novel and potential remedy for cutaneous wound healing and regeneration. *World J Stem Cells*. 2022;14(5):318-29
 69. Yang, S., et al. *Injectable hyaluronic acid hydrogels encapsulated with MSC-derived exosomes for enhanced soft tissue regeneration*. *Bioactive Materials*. 2021;6(11), 3754-3765.
 70. Guo, H., Cao, H., Lu, Q., Gu, Z., & Feng, G. TNF- α induces premature senescence in tendon stem cells via the NF- κ B and p53/p21/cyclin E/CDK2 signaling pathways. **International Journal of Molecular Medicine**, 2025;56. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2025.5581>
 71. Ge, Y., Li, M., Bai, S., Chen, C., Zhang, S., Cheng, J., & Wang, X. Doxercalciferol alleviates UVB-induced HaCaT cell senescence and skin photoaging. **International immunopharmacology**, 2023;127, 111357. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.111357>
 72. Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., & Giordano, A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. **Biomolecules**, 2020;10. <https://doi.org/10.3390/biom10030420>
 73. Geng, R., Kang, S., Huang, K., & Tong, T. Dietary supplementation with α -ionone alleviates chronic UVB exposure-induced skin photoaging in mice. **Food & function**2024. <https://doi.org/10.1039/d3fo04379g>
 74. Cavinato, M., & Jansen-Dürr, P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. **Experimental Gerontology**, 2017;94, 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.01.009>

75. Kim, D., Iwasaki, A., Chien, A., & Kang, S. UVB-mediated DNA damage induces matrix metalloproteinases to promote photoaging in an AhR- and SP1-dependent manner. *JCI Insight*, 2022;7. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.156344>.
76. Strickland, I., Rhodes, L., Flanagan, B., & Friedmann, P. TNF-alpha and IL-8 are upregulated in the epidermis of normal human skin after UVB exposure: correlation with neutrophil accumulation and E-selectin expression.. *The Journal of investigative dermatology*, 1997;108 5, 763-8. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12292156>
77. Bashir, M., Sharma, M., & Werth, V. TNF- α production in the skin. *Archives of Dermatological Research*, 2008;301, 87-91. <https://doi.org/10.1007/s00403-008-0893-7>
78. Bernard, J., Cowing-Zitron, C., Nakatsuji, T., Muehleisen, B., Muto, J., Borkowski, A., Martinez, L., Greidinger, E., Yu, B., & Gallo, R. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nature Medicine*, 2012;18, 1286-1290. <https://doi.org/10.1038/nm.2861>
79. Bashir, M., Sharma, M., & Werth, V. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF-alpha production in keratinocytes through enhanced gene transcription.. *The Journal of investigative dermatology*, 2009;129 4, 994-1001. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.332>
80. Song, H., Park, M., Lee, C., Park, S., Lee, J., Chung, K., & Lee, K. Anti-Photoaging Effects of a Standardized Hot Water Extract of *Petasites japonicus* Leaves in Ultraviolet B-Exposed Hairless Mice. *Pharmaceuticals*, 2025;18. <https://doi.org/10.3390/ph18101490>
81. Galvan, A., Lacavalla, M., Boschi, F., Cisterna, B., Pozza, E., Vigato, E., Carton, F., Malatesta, M., & Calderan, L. A Fluid Dynamic In Vitro System to Study the Effect of Hyaluronic Acid Administration on Collagen Organization in Human Skin Explants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025;26. <https://doi.org/10.3390/ijms26115397>
82. Yasin, A., Ren, Y., Li, J., Sheng, Y., Cao, C., & Zhang, K. Advances in Hyaluronic Acid for Biomedical Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.910290>
83. Chylińska, N., & Maciejczyk, M. Hyaluronic Acid and Skin: Its Role in Aging and Wound-Healing Processes. *Gels*, 2025;11. <https://doi.org/10.3390/gels11040281>
84. Mencarelli, N., Arena, D., Salamone, M., Pietrangelo, L., Berardi, A., Cataldi, A., Carradori, S., & Gallorini, M. The combination of hyaluronic

acids and collagen boosts human Achilles tendon-derived cell escape from inflammation and matrix remodeling in vitro. *Inflammation Research*, 2025;74. <https://doi.org/10.1007/s00011-024-01975-5>

85. Tang, Z., Liu, Z., Zhang, Y., Luo, S., Xu, Y., & Ren, L. Functional hyaluronic acid microneedles for skin photoaging based International journal of biological macromolecules, 2024;134080. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134080>
86. Gálvez-Martín, P., Soto-Fernandez, C., Romero- Rueda, J., Cabañas, J., Torrent, A., Castells, G., & Martínez-Puig, D. A Novel Hyaluronic Acid Matrix Ingredient with Regenerative, Anti-Aging and Antioxidant Capacity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023;24. <https://doi.org/10.3390/ijms24054774>
87. Chang, W., Chen, L., & Chen, K. The bioengineering application of hyaluronic acid in tissue regeneration and repair.. *International journal of biological macromolecules*, 2024;132454. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132454>
88. Berdiaki, A., Neagu, M., Spyridaki, I., Kuskov, A., Pérez, S., & Nikitovic, D.
Hyaluronan and Reactive Oxygen Species Signaling—Novel Cues from the Matrix?. *Antioxidants*, 2023;12. <https://doi.org/10.3390/antiox12040824>
89. Rosales, P., Vitale, D., Icardi, A., Sevic, I., & Alaniz, L. Role of Hyaluronic acid and its chemical derivatives in immunity during homeostasis, cancer and tissue regeneration. *Seminars in Immunopathology*, 2024;46. <https://doi.org/10.1007/s00281-024-01024-7>
90. Zaccaron, R., Barbieri, R., Mendes, C., Venturini, L., Alves, N., De Souza Mariano, S., De Andrade, T., De Araújo, P., Feuser, P., Thirupathi, A., Machado-De-Ávila, R., & Silveira, P. Photobiomodulation associated with lipid nanoparticles and hyaluronic acid accelerate the healing of excisional wounds. *Journal of Biomaterials Applications*, 2022;37, 668 - 682. <https://doi.org/10.1177/08853282221109344>.
91. Tutuianu, R., Rosca, A., Iacomi, D., Simionescu, M., & Titorencu, I. Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Promote In Vitro Wound Healing by Modulating the Biological Properties of Skin Keratinocytes and Fibroblasts and Stimulating Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22126239>
92. Bian, D., Wu, Y., Song, G., Azizi, R., & Zamani, A. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin

- wound healing: a comprehensive review. *Stem Cell Research & Therapy*, 2022;13. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02697-9>
93. Zhou, C., Zhang, B., Yang, Y., Jiang, Q., Li, T., Gong, J., Tang, H., & Zhang, Q. Stem cell-derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing. *Stem Cell Research & Therapy*, 2023;14. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03345-0>
 94. 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. <https://doi.org/10.3390/biom14040459>
 95. Zhuo, H., Chen, Y., & Zhao, G. Advances in application of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2024;12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1446050>
 96. Zhu, H., Guo, X., Zhang, Y., Khan, A., Pang, Y., Song, H., Zhao, H., Liu, Z., Qiao, H., & Xie, J. The Combined Anti-Aging Effect of Hydrolyzed Collagen Oligopeptides and Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Human Skin Fibroblasts. *Molecules*, 2024; 29. <https://doi.org/10.3390/molecules29071468>
 97. Angelina, J., Putra, A., Trisnadi, S., Hermansyah, D., Setiawan, E., Sumarawati, T., & Amalina, N. Hypoxia-conditioned mesenchymal stem cells (MSC) exosomes attenuate ultraviolet-B (UVB)-mediated malondialdehyde (MDA) and matrix metalloproteinase-1 (MMP)-1 upregulation in collagen loss models.. *Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*, 2025;22 1, 9-14. <https://doi.org/10.17392/1923-22-01>
 98. Wang, Z., Hu, Z., Niu, L., Xu, Y., & Qi, Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis based on rat model. *Frontiers in Pharmacology*, 2025;16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1588841>
 99. Shen, K., Duan, A., Cheng, J., Yuan, T., Zhou, J., Song, H., Chen, Z., Wan, B., Liu, J., Zhang, X., Zhang, Y., Xie, R., Liu, F., Fan, W., & Zuo, Q. Exosomes derived from hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells laden in a silk hydrogel promote cartilage regeneration via the miR-205-5p/PTEN/AKT pathway.. *Acta biomaterialia*. 2022; <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.02.026>
 100. Yu, H., Zhang, J., Yang, L., Tian, Y., Milne, C., Jin, P., Li, Q., Song, R., & Wang, W. MSC-derived exosomes injectable hyaluronic acid hydrogel for enhanced chronic wound healing.. *Journal of controlled release : official*

journal of the Controlled Release Society, 2025;113985.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113985>

101. Zhang, Y., Fang, M., Zhu, J., Li, T., Li, N., Su, B., Sun, G., Li, L., & Zhou, C. Exosome-loaded hyaluronic acid hydrogel composite with oxygen-producing 3D printed polylactic acid scaffolds for bone tissue repair and regeneration.. International journal of biological macromolecules, 2025;132970. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132970>
102. Zhang, Y., Xie, Y., Hao, Z., Zhou, P., Wang, P., Fang, S., Li, L., Xu, S., & Xia, Y. Umbilical Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome-Encapsulated Hydrogels Accelerate Bone Repair by Enhancing Angiogenesis.. ACS applied materials & interfaces. 2021; <https://doi.org/10.1021/acsami.0c22671>
103. Sadiq, I., Usman, A., Muhammad, A., Ahmad, K., Sample Size Calculation in Biomedical, Clinical and Biological Sciences Research. 2024

