

**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELL DAN *HYALURONIC*
ACID TERHADAP EKSPRESI GEN *MATRIX*
METALLOPROTEINASE-9 DAN *CYCLOOXIGENASE-2*
(Studi Eksprerimental Pada Tikus Wistar Model *Collagen Loss*
Akibat Paparan UVB)**

Tesis

untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister Ilmu Biomedik



Nabila Rifa Sari

MBK. 2424010516

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

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* DAN *HYALURONIC ACID* TERHADAP EKSPRESI GEN MATRIX *METALLOPROTEINASE-9* DAN *CYCLOOXIGENASE-2*

(Studi Eksperimental Pada Tikus Wistar Model Collagen Loss Akibat Paparan UVB)

Disusun oleh :

Nabila Rifa Sari

MBK. 2424010516

Telah dipertahankan di depan tim penguji
pada tanggal 12 Februari 2026
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

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 Unissula



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

LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI

Laporan Tesis Dengan Judul

Pengaruh Kombinasi Exosome Hypoxya Mesenchymal Stem Cell Dan Hyaluronid Acid Terhadap Ekpresi Gen Matrix Metalloproteinase-9 Dan Cyclooxygenase-2,

ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 12 Februari 2026

NO.	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1.	Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes	Penguji I	
2.	Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes	Penguji II	
3.	Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, SKM., M.Kes	Penguji III	
4.	Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS	Pembimbing I	
5.	Dr. Suparmi, S.Si, M.Si (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, 1 Februari 2026
Yang menyatakan,



(Nabila Rifa Sari)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Nabila Rifa Sari
Tempat, tanggal lahir : Jakarta, 8 April 1985
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Dharma Wanita Padangan, Jawa Timur : Lulus tahun 1991
2. SDN Kadipaten 4 Bojonegoro, Jawa Timur : Lulus tahun 1997
3. SMP Negeri 1 Bojonegoro, Jawa Timur : Lulus tahun 2000
4. SMA Negeri 1 Bojonegoro, Jawa Timur : Lulus tahun 2003
5. S1 Fakultas Kedokteran Universitas YARSI Jakarta : Lulus tahun 2007
6. Profesi Dokter Fakultas Kedokteran YARSI Jakarta : Lulus tahun 2010
7. Magister S2 Ilmu Biomedik UNISSULA Semarang : 2024 – Sekarang

C. Riwayat Keluarga

Nama Ayah : Masruhin Irfan
Nama Ibu : Any Rufaida
Nama Suami : Ahmad Qomaru Zaman
Nama Anak :
1. Vanilla Humaira Irbah
2. Ahmad Hazel Ghani
3. Ahmad Maccadamia Abdilla

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* DAN *HYALURONIC ACID* TERHADAP EKSPRESI GEN *MATRIX METALLOPROTEINASE-9* DAN *CYCLOOXYGENASE-2* (Studi eksperimental pada tikus wistar model collagen loss akibat paparan UVB)** Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

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

4. Dr. dr. Eko Setiawan Sp.B, FINACS selaku dosen pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
5. Dr. Suparmi, S.Si., M.Si (ERT) selaku dosen pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes selaku dosen penguji I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
7. 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.
8. Prof. Dr Siti Thomas Z, SKM. Mkes selaku dosen penguji III dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
9. 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.
10. 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, 1 Februari 2026



(Nabila Rifa Sari)

ABSTRAK

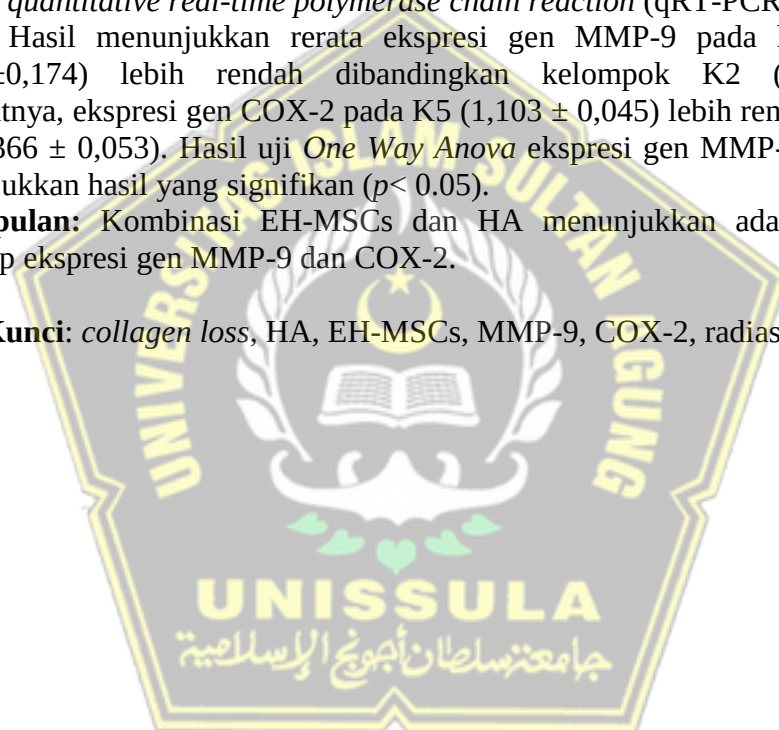
Latar Belakang: Paparan ultraviolet B (UVB) menyebabkan terjadinya *collagen loss* sebagai akibat dari proses *fotoaging*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi *exosome hypoxia mesenchymal stem cells* (EH-MSCs) dan *Hyaluronic Acid* (HA) terhadap ekspresi MMP-9 dan COX-2 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

Metode: Jenis penelitian *true experimental* dengan desain *post-test only control group design*. Dibagi ke dalam lima kelompok yaitu K1=kontrol sehat; K2=UVB+NaCl 0,9%; K3= UVB+HA; K4=UVB+EH-MSCs ($2,5 \times 10^5$ sel); K5=UVB+HA+EH-MSCs. Ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 dianalisis menggunakan metode *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR).

Hasil: Hasil menunjukkan rerata ekspresi gen MMP-9 pada kelompok K5 ($1,243 \pm 0,174$) lebih rendah dibandingkan kelompok K2 ($3,148 \pm 0,199$). Selanjutnya, ekspresi gen COX-2 pada K5 ($1,103 \pm 0,045$) lebih rendah dibanding K2 ($2,366 \pm 0,053$). Hasil uji *One Way Anova* ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 menunjukkan hasil yang signifikan ($p < 0.05$).

Kesimpulan: Kombinasi EH-MSCs dan HA menunjukkan adanya pengaruh terhadap ekspresi gen MMP-9 dan COX-2.

Kata Kunci: *collagen loss*, HA, EH-MSCs, MMP-9, COX-2, radiasi UVB



ABSTRACT

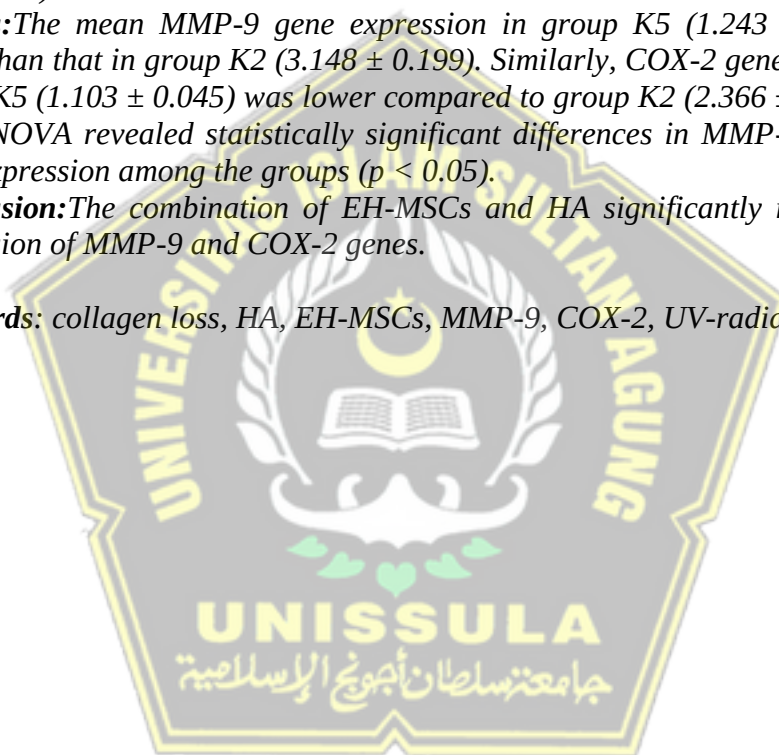
Background: Ultraviolet B (UVB) exposure induces collagen loss as a component of the photoaging process. This study aimed to evaluate the effects of EH-MSCs and hyaluronic acid (HA) on MMP-9 and COX-2 gene expression in Wistar rats subjected to UVB-induced collagen loss.

Methods: This study employed a true experimental design with a post-test only control group design. The animals were divided into five groups: K1 (healthy control); K2 (UVB + 0.9% NaCl); K3 (UVB + HA); K4 (UVB + EH-MSCs [2.5×10^5 cells]); and K5 (UVB + HA + EH-MSCs). Gene expression levels of MMP-9 and COX-2 were analyzed using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Results: The mean MMP-9 gene expression in group K5 (1.243 ± 0.174) was lower than that in group K2 (3.148 ± 0.199). Similarly, COX-2 gene expression in group K5 (1.103 ± 0.045) was lower compared to group K2 (2.366 ± 0.053). One-way ANOVA revealed statistically significant differences in MMP-9 and COX-2 gene expression among the groups ($p < 0.05$).

Conclusion: The combination of EH-MSCs and HA significantly modulated the expression of MMP-9 and COX-2 genes.

Keywords: collagen loss, HA, EH-MSCs, MMP-9, COX-2, UV-radiation



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	v
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
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.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9).....	11
2.1.1. Definisi	11
2.1.2. Peran dan Mekanisme Seluler MMP-9 dalam <i>Collagen Loss</i> ..	12
2.1.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ekspresi MMP-9	15
2.2. Cyclooxygenase (COX2).....	17
2.2.1. Definisi dan Karakteristik COX-2	17

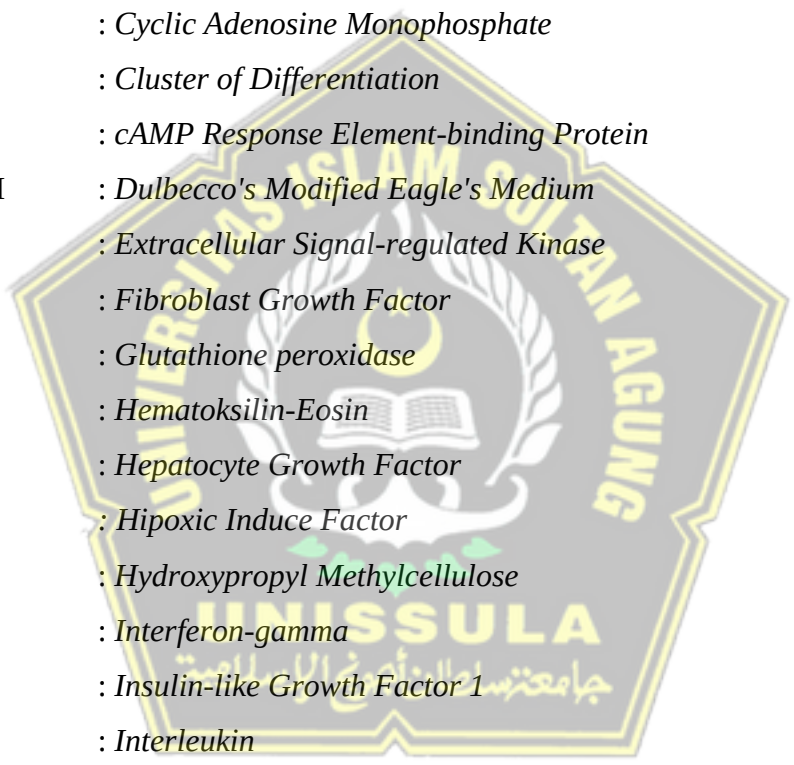
2.2.2.	Regulasi Molekuler COX-2	19
2.2.3.	Mekanisme COX-2 pada Collagen Loss di Paparan UVB	21
2.2.4.	Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ekspresi COX-2	28
2.3.	Mesenchymal Stem Cells (MSCs).....	31
2.3.1.	Definisi MSCs	31
2.3.2.	Peran MSCs	32
2.3.3.	Konsep <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSC.....	32
2.3.4.	Induksi <i>Small Molecule</i> dan <i>Exosome</i> MSC.....	35
2.3.5.	<i>Exosome</i> Hypoxia MSCs (EH-MSCs).....	36
2.3.6.	<i>Peran Exosome</i> Hypoxia MSCs (EH-MSCs) dalam Mencegah <i>Collagen Loss</i>	38
2.4.	Kolagen.....	40
2.4.1.	Struktur dan Fungsi Kolagen dalam Kulit	40
2.4.2.	Homeostasis Kolagen dan Faktor Regulasi	42
2.4.3.	Patofisiologi <i>Collagen Loss</i>	44
2.5.	Hyaluronic Acid	45
2.5.1.	Definisi	45
2.5.2.	Struktur Molekul HA	46
2.5.3.	Mekanisme Molekuler HA dalam Menginduksi Produksi Kolagen.....	47
2.5.4.	Aplikasi HA pada Kulit	48
BAB III KERANGKA TEORI		50
3.1.	Kerangka Teori	50
3.2.	Kerangka Konsep	55
3.3.	Hipotesis	55
BAB IV METODE PENELITIAN		56
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	56
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	58
4.2.1.	Variabel Penelitian.....	58
4.2.2.	Definisi Operasional	58
4.3.	Populasi dan Sampel Penelitian.....	60

4.3.1. Subjek Penelitian	60
4.3.2. Sampel Penelitian	61
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian	61
4.3.4. Besar Sampel	62
4.4. Alat dan Bahan	62
4.4.1. Alat	62
4.4.2. Bahan	63
4.5. Cara Penelitian.....	63
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	63
4.5.2. Penyinaran UV-B dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan.....	63
4.5.3. Pengambilan Sampel jaringan	64
4.5.4. Validasi Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan Kolagen.....	64
4.5.5. Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen MMP-9 dan COX-2 dengan qRT-PCR.....	65
4.6. Tempat dan Waktu Peneltian.....	66
4.7. Analisa Data	66
4.8. Alur Penelitian.....	68
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	69
5.1. Hasil Penelitian.....	69
5.1.1. Hasil Validasi Collagen Loss pada tikus yang dipapar UVB ...	69
5.1.2. Hasil Validasi <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i> (EH-MSCs)	71
5.1.3. Efek kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap Ekspresi Gen MMP-9.....	77
5.1.4. Efek kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap Ekspresi gen COX-2.....	80
5.2. Pembahasan	83
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	91
6.1. Kesimpulan.....	91

6.2. Saran	91
DAFTAR PUSTAKA	92
LAMPIRAN	104



DAFTAR SINGKATAN

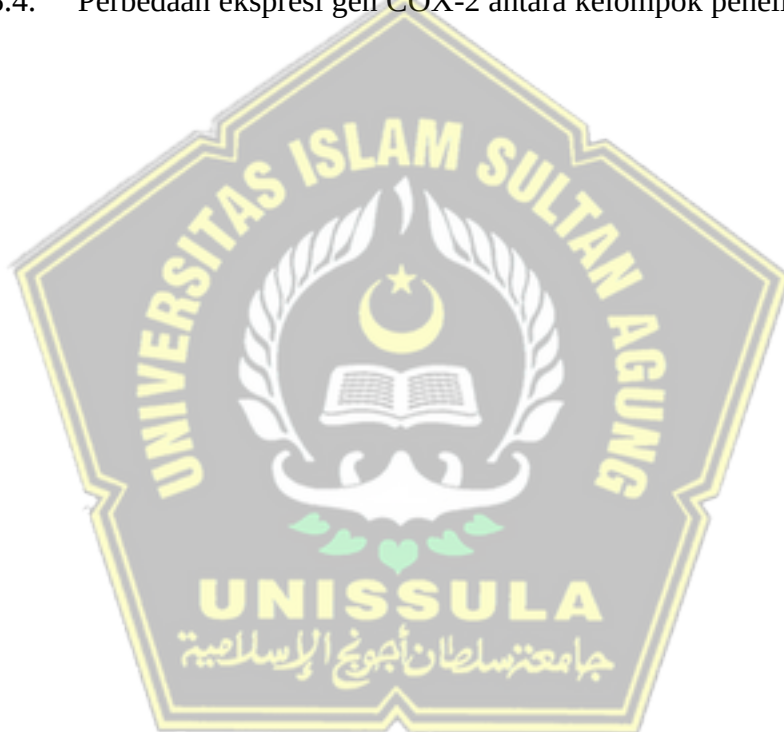


ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
HE	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine</i>
MAPK	: <i>Mitogen-actived Protein Kinases</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>

MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
SOCS3	: <i>Supressor Of Cytokine Signaling 3</i>
SOD	: <i>SuperOxideDismutase</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Acitvator Transcription</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-β1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Ekspresi Gen MMP-9	78
Tabel 5.2.	Perbedaan Ekspresi Gen MMP-9 antara kelompok penelitian	79
Tabel 5.3.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas Pada Ekspresi Gen COX-2	81
Tabel 5.4.	Perbedaan ekspresi gen COX-2 antara kelompok penelitian.....	82



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Peran MMPs dalam Proses Penurunan Kadar Kolagen	14
Gambar 2.2.	Mekanisme Paparan UVB Mengaktivasi COX-2.....	21
Gambar 2.3.	Mekanisme Molekuler Sinar UVB mengaktivasi Jalur Inflamasi Melalui PGE-2	27
Gambar 2.4.	Peran MSCs pada Proses Regenerasi di Kulit Karena Paparan Sinar UVB ⁸²	34
Gambar 2.5.	Komponen yang dikeluarkan oleh MSCs	36
Gambar 2.6.	UVB menginduksi <i>Collagen loss</i>	44
Gambar 2.7.	Struktur Kimia HA	46
Gambar 2.8.	Mekanisme HA mempengaruhi sitokin inflammasi melalui reseptor CD44.....	48
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	54
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	55
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian	57
Gambar 4.2.	Alur penelitian.....	68
Gambar 5.1.	Gambaran makroskopis pengamatan secara visual menggunakan kamera handphone pada tikus	70
Gambar 5.2.	Gambaran mikroskopis pengamatan menggunakan mikroskop Cahaya pada tikus.....	71
Gambar 5.3.	Hasil pengamatan bentuk <i>spindel-like</i> EH-MSCs dengan pembesaran 100x	71
Gambar 5.4.	Ekspresi CD90, CD29, CD45, CD31 pada MSCs.....	72
Gambar 5.5.	Hasil Diferensiasi MSCs menjadi osteosit (pewarnaan Alizarin-red, perbesaran 200x) (A); dan MSCs berdiferensiasi menjadi kondrosit (pewarnaan Alizarin Blue perbesaran 100x) (B).	74
Gambar 5.6.	Validasi dan Kuantifikasi Exosome MSCs Menggunakan Flow Cytometry.	76
Gambar 5.7.	Ekspresi gen COX-2 pada berbagai kelompok perlakuan.	83

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	104
Lampiran 2. Hasil Uji SPSS.....	105
Lampiran 3. Surat Keterangan Penelitian dan Hasil Analisis	111
Lampiran 4. Surat Ijin Penelitian	114
Lampiran 5. Surat Keterangan Kesehatan Hewan	115
Lampiran 6. Foto Penelitian.....	116



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radiasi ultraviolet B (UVB) merupakan salah satu faktor utama penyebab kerusakan kulit kronis yang ditandai dengan penurunan kolagen dermal¹⁻³. Paparan UVB dapat menembus epidermis hingga dermis, menyebabkan akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) sehingga menginduksi stres oksidatif, peroksidasi lipid, dan aktivasi berbagai jalur inflamasi serta degradasi matriks ekstraseluler, termasuk kolagen.⁴ Akumulasi ROS berperan sebagai sinyal sekunder yang mengaktifkan jalur pensinyalan intraseluler *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B). Aktivasi MAPK akan mengaktifkan faktor transkripsi protein-1 (AP-1) dan memicu pelepasan *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9) yang merupakan enzim proteolitik utama dalam degradasi kolagen dan komponen matriks ekstraseluler lainnya. Aktivasi NF- κ B memicu pelepasan *cyclooxygenase-2* (COX-2) dan respon *prostaglandin-E2* (PGE2) untuk meningkatkan *interleukin-6* (IL-6). Namun, bagaimana ekspresi gen MMP-9 and COX-2 pada kondisi *collagen loss* akibat UVB setelah mengalami berbagai terapi belum banyak diteliti.

Insidensi *collagen loss* akibat paparan UVB di negara tropis seperti Indonesia tetap mencapai angka 72% seiring dengan tingginya intensitas paparan sinar matahari sepanjang tahun.⁵ Data terbaru menunjukkan bahwa kerusakan kulit akibat radiasi UV, termasuk *collagen loss* berkontribusi

pada 80% kasus penuaan kulit dan menjadi faktor risiko utama terjadinya kanker kulit. Efek *collagen loss* akibat UVB juga memperburuk kualitas hidup masyarakat, terutama pada populasi yang sering terpapar sinar matahari tanpa perlindungan memadai. Pada tahun 2015, 4.2% dari 142 subjek positif mengalami penurunan kolagen setelah terpapar tiga kali UVB pada *minimal erythema dose* (MED).⁶ Laporan penelitian pada tahun 2025 menunjukkan bahwa paparan sinar UVB dosis tinggi 750 MED menurunkan kolagen pada 50% subjek penelitian.⁷

Terapi yang saat ini digunakan untuk mengatasi *collagen loss* akibat paparan UVB adalah dengan pemberian senyawa kimia seperti hyaluronic acid (HA). Penggunaan HA dapat meningkatkan sintesis kolagen melalui aktivasi reseptor *cluster of differentiatin 44* (CD44) dan *jalur transforming growth factor- β* (TGF- β), namun dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek samping berupa iritasi kulit, kekeringan, kemerahan, bahkan pada beberapa kasus dapat meningkatkan sensitivitas kulit dan memicu risiko kanker kulit.⁸

Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs) merupakan vesikel ekstraseluler berukuran 40–150 nm yang dilepaskan oleh MSCs, yang mengandung berbagai molekul bioaktif seperti miRNA yaitu miR-21, miR-125b-5p dan growth factor TGF- β , *Platet Derived Growth Factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), serta sitokin antiinflamasi interleukin-10 (IL-10) yang secara sinergis mampu menekan stres oksidatif, inflamasi, dan menstimulasi regenerasi

matriks kolagen.⁹⁻¹¹ EH-MSCs dilaporkan berpengaruh menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) dan meningkatkan densitas kolagen dermal pada tikus galur wistar.¹¹ EH_MSCs mengaktivasi jalur *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang meningkatkan ekspresi enzim antioksidan *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPX), *catalase* (CAT). EH-MSCs menekan sitokin proinflamasi IL-6 dan merangsang reepitelialisasi sel fibroblast pada model *wound healing*.¹² Kandungan growth factor pada EH-MSCs yaitu TGF- β , *vascular endothelial growth factor* (VEGF), PDGF, HGF^{13,14} menginduksi peningkatan kadar kolagen pada *melan-a cell line* ¹⁵. Akan tetapi, efektivitas EH-MSCs yang dikombinasikan dengan HA terhadap ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 pada tikus model *collagen loss* dipapar UV-B belum diteliti.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA pada hewan coba tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB. Kombinasi EH-MSCs dan HA diberikan secara injeksi subkutan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendorong pengembangan terapi *cosmocetical* untuk *collagen loss* menggunakan kombinasi HA dan EH-MSCs.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat dirumuskan adalah "Apakah terdapat pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain untuk :

- a. Mengukur dan membandingkan ekspresi gen MMP-9 pada pemberian kombinasi EH-MSCs dosis 200 μ L dan HA 2,4 % b/v dosis 200 μ L secara injeksi subkutan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB dibandingkan kontrol negatif.
- b. Mengukur dan membandingkan ekspresi gen COX-2 pada pemberian kombinasi EH-MSCs dosis 200 μ L dan HA 2,4 %b/v dosis 200 μ L secara injeksi subkutan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB dibandingkan kontrol negatif.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi/ dasar penelitian lebih lanjut mengenai efektifitas kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendorong pemanfaatan HA yang dikombinasikan dengan EH-MSCs sebagai terapi *collagen loss* akibat paparan UVB.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Hu et al, 2019 ⁹	<i>Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging</i>	<i>In vivo</i>	Exosome menyebabkan peningkatan ekspresi prokolagen tipe I dan penurunan ekspresi MMP-1 yang signifikan, terutama melalui penurunan regulasi <i>tumor necrosis factor-alpha</i> (TNF- α) dan peningkatan regulasi <i>transforming growth factor beta</i> (TGF- β).
2	Basalova et al, 2019 ¹⁶	<i>Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated</i>	<i>In vivo</i>	MSCs mencegah diferensiasi myofibroblas dan pembentukan ECM yang dapat menyebabkan

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
		<i>microRNAs within Extracellular Vesicles</i>		turunnya produksi kolagen.
3	You et al, 2023 ¹⁷	<i>Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy</i>	<i>In vivo</i>	Pemberian MSCs meningkatkan produksi collagen A1, dan mencegah degradasi ekstra seluler matriks
4	Yu et al, 2023 ¹⁸	<i>Exosome derived from E2F1-/- Adipose-derived stem cells promote skin wound healing via miR-130b-5p/TGFBR3 Axis</i>	<i>In vivo</i>	Exosome yang dihasilkan dari ADSC E2F1-/- mempercepat penyembuhan luka kulit secara signifikan melalui transfer miR-130b-5p yang menekan TGFBR3 dan mengaktifkan jalur TGF-beta, sehingga produksi kolagen dan angiogenesis meningkat.
5	Park et al, 2023 ¹⁹	<i>Exosomes derived from human dermal fibroblasts protect against UVB-induced skin photoaging</i>	<i>In vitro</i> dan <i>in vivo</i>	Exosome fibroblas kulit manusia secara menurunkan ekspresi γ H2AX, ROS, MMP-1, β -galactosidase, p16, inflamason/NF- κ B, dan TEWL. Serta meningkatkan ekspresi SOD1/2, GPx, catalase, Nrf2, RAD52, kolagen tipe I, elastin, TGF- β 1/Smad, IGF-1, VEGF pada model fotoaging.

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
6	Zhu et al, 2024 ²⁰	<i>The Combined Anti-Aging Effect of Hydrolyzed Collagen Oligopeptides and Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Human Skin Fibroblasts</i>	<i>In vitro</i> dan <i>in vivo</i>	Kombinasi kolagen oligopeptida terhidrolisis dan Exosome UCMSC secara sinergis meningkatkan proliferasi dan migrasi fibroblast dengan meningkatkan Collagen type I, elastin, fibronectin, catalase, SOD1/2, mengurangi kematian sel, serta menurunkan tingkat penuaan sel.
7	Vo et al, 2024 ²¹	<i>Synergistic Anti-Aging Effects of Adipose-Derived Stem Cell Extracellular Vesicles Loaded With Natural Compounds</i>	<i>In vitro</i>	kombinasi ekstra seluler vesikel dan senyawa alami nicotinamide roboside, resveratrol, vitamin c, retinol, dan arbutin ini bekerja sinergis untuk mengurangi stres oksidatif, menekan enzim perusak kolagen, meningkatkan sintesis kolagen, dan mengurangi pigmentasi.
8	Angelina et al, 2025 ¹¹	<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>	<i>In vivo</i> ,	EH-MSCs memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dengan mengurangi ekspresi MDA dan MMP-1 pada tikus model collagen loss akibat paparan UVB

Penelitian yang dilakukan oleh Shiqi Hu *et al* pada tahun 2019 menunjukkan bahwa *exosome* yang berasal dari *human dermal fibroblast spheroids* dapat meningkatkan ekspresi prokolagen tipe I dan menurunkan ekspresi MMP-1 secara signifikan melalui modulasi regulasi TNF- α dan TGF- β .⁹ Fokus utama penelitian tersebut adalah pada remodeling matriks kulit dengan analisis prokolagen I dan MMP-1, namun penelitian tersebut belum membahas secara spesifik peran MMP-9 dan COX-2 dalam proses inflamasi dan degradasi kolagen akibat paparan sinar UVB. Pada penelitian ini akan menganalisis ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 pada model tikus *collagen loss* akibat paparan UVB, sehingga menghasilkan data yang lebih mendalam terkait jalur inflamasi dan degradasi matriks ekstraseluler.

Penelitian oleh Basalova *et al* (2019) fokus pada mekanisme MSC mencegah diferensiasi myofibroblas dan pembentukan matriks ekstraseluler yang dapat menurunkan produksi kolagen, melalui transfer microRNA pada *extracellular vesicles*.¹⁶ Penelitian tersebut berfokus pada mekanisme fibrosis kulit, tetapi tidak mengeksplorasi efek *exosome hypoxia* maupun kombinasi dengan asam hialuronat dalam proses inflamasi matriks dan model *collagen loss* akibat UVB. Penelitian ini mengisi kekurangan penelitian sebelumnya yaitu dengan menguji kombinasi *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* dan *hyaluronic acid* pada ekspresi MMP-9 dan COX-2 sebagai marker spesifik inflamasi kulit.

Studi yang dilakukan oleh Yi You *et al* (2023) memperlihatkan bahwa pemberian *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* secara intradermal

mampu meningkatkan produksi kolagen A1 dan mencegah degradasi matriks ekstraseluler.¹⁷ Namun, penelitian ini hanya memantau peningkatan kolagen tanpa mengidentifikasi ekspresi penanda inflamasi seperti MMP-9 dan COX-2 serta belum memanfaatkan kombinasi dengan *hyaluronic acid*. Pada penelitian ini lebih memfokuskan analisis pada dua penanda inflamasi tersebut serta menggandeng efek sinergis *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* dan *hyaluronic acid* pada model *in vivo collagen loss* akibat UVB.

Penelitian lain oleh Honghao Yu *et al* pada tahun 2023 melaporkan bahwa *exosome* yang dihasilkan dari ADSC E2F1-/- yang mempercepat penyembuhan luka kulit melalui regulasi *microRNA* spesifik miR-130b-5p dan aktivasi jalur TGF-beta, sehingga terjadi peningkatan produksi kolagen dan angiogenesis.¹⁸ Meskipun studi ini menjelaskan mekanisme molekuler penyembuhan luka, namun fokus eksplorasinya bukan pada efek kombinasi eksosom hipoksia-MSC dan *hyaluronic acid*, maupun analisis marker inflamasi matriks MMP-9 dan COX-2 pada aging kulit akibat UVB.

Penelitian A Yeon Park *et al* pada tahun 2023 mengidentifikasi bahwa *exosome* dari fibroblas kulit manusia mampu menurunkan ekspresi berbagai marker penuaan serta inflamasi dan secara simultan meningkatkan ekspresi enzim antioksidan dan faktor pertumbuhan.¹⁹ Akan tetapi, penelitian tersebut belum berfokus pada marker degradasi matriks secara spesifik seperti MMP-9 dan COX-2, serta belum menguji efek sinergis dengan *hyaluronic acid* pada model *collagen loss* UVB. Penelitian ini memberikan keterbaruan dengan analisis lebih terarah pada jalur inflamasi matriks kulit.

Selain itu, penelitian lain menggabungkan kolagen oligopeptida terhidrolisis dengan exosome UCMSC untuk menunjang proliferasi dan migrasi fibroblast serta ekspresi kolagen dan elastin.²⁰ Penelitian tersebut lebih mengeksplorasi regenerasi jaringan dan penuaan sel, tanpa mengkaji marker inflamasi matriks MMP-9 dan COX-2, serta belum menggunakan kombinasi *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* dan *hyaluronic acid* pada model *in vivo collagen loss* akibat UVB sebagaimana yang dilakukan penelitian ini.

Selanjutnya, penelitian Nhan Vo tahun 2024 menggabungkan *extracellular vesicle* dengan bahan alami untuk menekan enzim perusak kolagen, meningkatkan sintesis kolagen, dan menurunkan pigmentasi.²¹ Namun, penelitian tersebut belum memfokuskan pada efek protektif kombinasi *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* dan *hyaluronic acid* terhadap marker spesifik MMP-9 dan COX-2 dalam model collagen loss UVB seperti yang dieksplorasi dalam penelitian ini. Pada penelitian Jessica Angelina pada tahun 2025 telah menggunakan *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* pada model tikus *collagen loss* UVB, namun hanya mengukur penanda MDA dan MMP-1¹¹ serta belum memanfaatkan sinergi kombinasi *hyaluronic acid*. Penelitian ini mengisi gap tersebut dengan analisis simultan ekspresi MMP-9 dan COX-2, yang berperan penting dalam mekanisme inflamasi dan perlindungan matriks kulit pada proses penuaan akibat paparan UVB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)*

2.1.1. Definisi

Matrix metalloproteinases (MMPs) adalah endopeptidase yang mengandung zinc dengan berbagai spesifisitas substrat dan terikat dengan membran yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi berbagai komponen protein *extracellular matrix* (ECM)²³. Struktur dan spesifisitas substrat MMPs dapat dikategorikan ke dalam lima subkelompok utama, yaitu (1) kolagenase (MMP-1, MMP-8 dan MMP-13); (2) gelatinase (MMP-2 dan MMP-9); (3) stromelisin (MMP-3, MMP-10 dan MMP-11); (4) matrilisin (MMP-7 dan MMP-26); dan (5) MMP tipe membran (MT) (MMP-14, MMP-15, dan MMP-16)³³. Endopeptidase ini disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dermal sebagai respons terhadap berbagai rangsangan seperti stres oksidatif, radiasi *ultraviolet*, dan sitokin²⁵.

MMPs terdiri dari 28 jenis yang berbeda telah diidentifikasi dan memainkan peran penting dalam berbagai proses patofisiologis termasuk penyembuhan luka, pertumbuhan tulang dan *remodelling*, arthritis, inflamasi, angiogenesis, kanker, dan *photoaging*³⁰. Penelitian Chan *et al* (2020) melaporkan bahwa paparan UVB meningkatkan setidaknya tiga MMPs yang berbeda pada kulit mencit secara *in vivo*, yaitu *interstitial collagenase* (MMP-1),

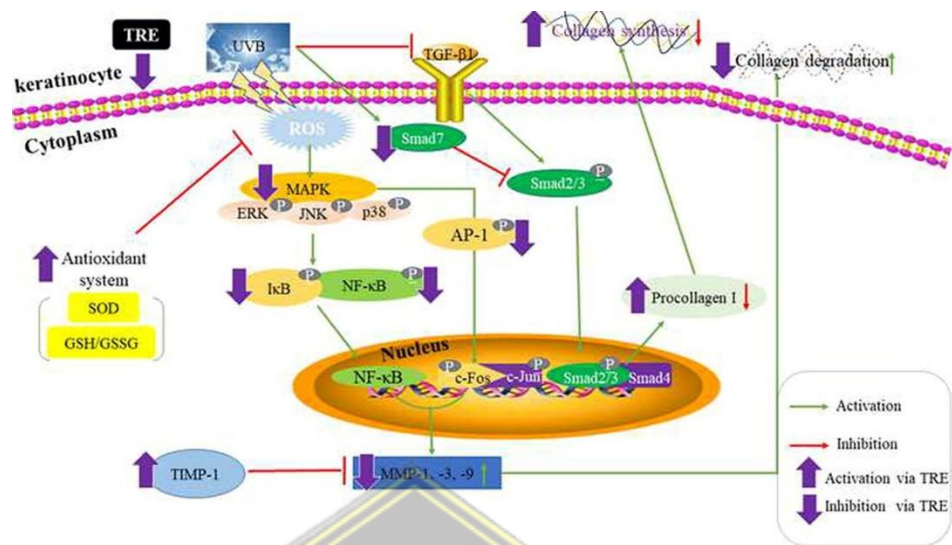
stromelysin-1 (MMP-3), dan 92 -kD *gelatinase* (MMP-9). MMP-1, MMP-3, and MMP-9 diatur secara kuat oleh faktor transkripsi *activator protein-1* (AP-1), yang secara cepat dipapar dan diaktifkan oleh radiasi UV pada kulit manusia secara *in vivo* serta memiliki kapasitas untuk mendegradasi sebagian besar protein yang menyusun ECM dermal.^{26,27}

2.1.2. Peran dan Mekanisme Seluler MMP-9 dalam *Collagen Loss*

Collagen loss merupakan penurunan kadar kolagen pada kulit yang disebabkan oleh paparan UVA dan UVB yang dapat menginduksi stres oksidatif pada kulit manusia dan menyebabkan kerusakan genetik temporal dan persisten. Hal ini menyebabkan Peningkatan regulasi aktivitas *activator protein* (AP)-1, dan peningkatan ekspresi MMP²⁸⁻³¹. Proses penurunan kadar kolagen, *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler berlebih yang dipapar UV mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) dan *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) yang berpuncak pada regulasi transkripsi MMP, dan menghasilkan degradasi kolagen dan elastin, yang berlanjut ke *photoaging*. Namun, peningkatan ROS dan aktivasi AP-1 akibat UVB menghambat jalur Smad, sehingga sintesis kolagen menurun. Akibatnya, terjadi ketidakseimbangan antara degradasi dan sintesis kolagen.. (Gambar 2.1).³²

MMPs yang diekspresikan pada kulit manusia normal, hanya tiga yang dipapar secara signifikan sebagai respons terhadap

penyinaran *ultraviolet* (UV), yaitu MMP-1 (kolagenase), MMP-3 (stromelysin-1), dan MMP-9 (92kD gelatinase). Pada kulit, keratinosit epidermis dan fibroblas dermal mensekresi kolagenase MMP-1 yang yang mendegradasi kolagen fibrilar tipe I dan III menjadi fragmen-fragmen spesifik di dalam triple heliks sentral. Gelatinase MMP-9 kemudian menghidrolisis fragmen ini yang pada akhirnya merusak fungsi dermis kaya kolagen^{33,35}. Paparan sinar UV menginduksi peningkatan sintesis dan ekspresi gen MMP-1 oleh fibroblast dermal, yang dirangsang oleh pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) berlebih, dan memainkan peran penting dalam penurunan kolagen (Gambar 2.1). Iradiasi UV menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) yang mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)³³.



Gambar 2.1. Peran MMPs dalam Proses Penurunan Kadar Kolagen^{34,35}

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) adalah kinase Ser/Thr yang diaktivasi oleh prolin yang terdiri dari *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) yang menstimulasi ekspresi c-Fos, p38 dan c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) yang menstimulasi ekspresi c-Jun.³⁶ Kombinasi c-Jun dengan c-Fos membentuk faktor transkripsi AP-1 yang memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 dan mengakibatkan degradasi kolagen.^{34,37} Ekspresi AP-1 dapat menghambat *transforming growth factor-β* (TGF-β) yang merupakan pengatur utama produksi prokolagen tipe I pada kulit manusia sehingga menyebabkan penurunan sintesis prokolagen³⁸. ROS juga terbukti menginduksi aktivasi transkripsi yang dimediasi NF-κB dan regulasi ekspresi gen MMP. Aktivitas NF-κB bertanggung jawab atas up-regulasi MMP-1 dan MMP-3 pada fibroblas dermal.³⁹ Ketiga MMP

tersebut mendegradasi sejumlah besar protein ECM, seperti kolagen tipe IV, V, IX, dan X, gelatin, fibrillin-1, fibronektin, laminin, dan proteoglikan. Fungsi utama MMP-3 adalah mengaktivasi pro-MMP seperti kolagenase, gelatinase B, dan matrilisin selama pergantian ECM. Produksi MMP-9 dan MMP-1 sangat penting untuk mengaktifkan sebagian pro-MMP-9.^{40,41}

2.1.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ekspresi MMP-9

Paparan sinar UVB pada kulit menginduksi kerusakan DNA langsung melalui pembentukan *cyclobutane pyrimidine dimers* dan *6-4 photoproducts* di keratinosit dan fibroblas dermis, yang memicu respons stres seluler dan aktivasi enzim *NADPH oksidase* (NOX1, NOX2, NOX4).⁴¹ Aktivasi *NADPH oksidase* menghasilkan ROS seperti superoksida dan hidrogen peroksida, yang kemudian membentuk radikal hidroksil melalui reaksi Fenton, menciptakan stres oksidatif masif di jaringan kulit. ROS tidak hanya menyebabkan kerusakan oksidatif, tetapi juga berfungsi sebagai second messenger yang mengaktivasi jalur transduksi sinyal utama seperti *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dan JAK2/STAT3 yang secara kolektif berperan dalam meningkatkan ekspresi *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9), enzim utama yang bertanggung jawab atas degradasi kolagen.^{43,44}

Pada jalur MAPK, ROS mengoksidasi protein tyrosine phosphatases sehingga mengaktivasi Ras-GTP dan memicu kaskade

Raf-MEK-ERK, JNK, dan p38 MAPK. Aktivasi ketiga subfamili MAPK ini menyebabkan fosforilasi target seperti c-JUN dan ATF-2, yang meningkatkan aktivitas transkripsi kompleks *activator protein-1* (AP-1).^{7,45} AP-1 berperan dominan dalam mengikat promotor gen MMP-9 dan menginduksi ekspresinya secara signifikan. Selain itu, ROS juga mengaktivasi NF- κ B dengan cara memfosforilasi dan menginduksi degradasi inhibitor I κ B, sehingga NF- κ B dapat bertranslokasi ke nukleus dan mengaktifkan transkripsi gen MMP-9 serta sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-8. Sitokin ini memperkuat ekspresi MMP-9 melalui mekanisme autocrine dan paracrine, membentuk lingkaran umpan balik positif yang memperpetual kerusakan kolagen.^{34,46}

Jalur JAK2/STAT3 juga turut berkontribusi, di mana ROS menginduksi aktivasi JAK2 yang kemudian memfosforilasi STAT3, menyebabkan dimerisasi dan translokasi STAT3 ke nukleus. STAT3 aktif bersama AP-1 dan NF- κ B membentuk kompleks transkripsi yang sangat kondusif untuk ekspresi MMP-9 yang masif, sekaligus menginduksi gen pro-inflamasi dan pro-survival lainnya yang memperpanjang kondisi patologis.^{47,48}

Disisi lain peningkatan ROS dan kerusakan seluler merangsang pelepasan *cytokine pro-inflammatory*, terutama IL-1, IL-8, dan TNF- α , yang kemudian memperkuat respons inflamasi dan memperbesar aktivasi jalur pensinyalan intraseluler.⁴⁹ IL-1

menginduksi MMP-9 melalui aktivasi jalur MyD88-IRAK-TRAF6 dan NF- κ B, sedangkan IL-8 sebagai chemoattractant neutrofil juga mengaktivasi ekspresi MMP-9 melalui reseptor CXCR1/2.⁵⁰ TNF- α memperkuat induksi MMP-9 dengan efek pleiotropik melalui aktivasi langsung jalur NF- κ B dan MAPK serta stimulasi produksi sitokin inflamasi lainnya. Jalur PI3K/AKT teraktivasi melalui inaktivasi PTEN oleh ROS, menyebabkan akumulasi PIP3 dan aktivasi PDK1 serta AKT.⁵¹ AKT aktif mengamplifikasi jalur NF- κ B dan MAPK yang juga menginduksi ekspresi MMP-9, serta memproduksi enzim *indoleamine 2,3-dioxygenase 1* (IDO1) yang mendukung inflamasi kronis dan ekspresi MMP-9 yang berkelanjutan.³²

Selain peningkatan ekspresi MMP-9, paparan UVB juga mengganggu keseimbangan antara MMP-9 dan *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1), dengan ekspresi MMP-9 yang jauh lebih tinggi dibanding TIMP-1.^{31,39} Ketidakseimbangan proteolitik ini memperkuat degradasi kolagen karena aktivitas proteolitik MMP-9 yang bebas dikendalikan, terutama saat pro-MMP-9 diaktivasi di ruang ekstraseluler oleh protease atau ROS.⁴¹

2.2. Cyclooxygenase (COX2)

2.2.1. Definisi dan Karakteristik COX-2

Cyclooxygenase-2 (COX-2) atau prostaglandin G/H synthase-2 (PTGS2) adalah enzim inducible yang termasuk dalam keluarga

cyclooxygenase, berperan dalam jalur biosintesis prostaglandin dari asam arakidonat. COX-2 merupakan enzim bifungsional yang memiliki aktivitas cyclooxygenase dan peroxidase, mengkatalisis dua reaksi berurutan yaitu oksigenasi asam arakidonat menjadi prostaglandin G₂ (PGG₂) melalui aktivitas cyclooxygenase; kedua, reduksi PGG₂ menjadi prostaglandin H₂ (PGH₂) melalui aktivitas peroxidase.⁵¹ PGH₂ yang dihasilkan selanjutnya dikonversi oleh enzim-enzim spesifik menjadi berbagai prostaglandin bioaktif, termasuk prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandin D₂ (PGD₂), prostacyclin (PGI₂), dan thromboxane A₂ (TXA₂). Struktur COX-2 terdiri dari 604 asam amino dengan berat molekul sekitar 72 kDa, memiliki homologi 60% dengan COX-1 tetapi berbeda dalam regulasi ekspresi dan fungsi fisiologis.⁵³

COX-2 berbeda dengan COX-1 yang bersifat *constitutive* dan diekspresikan secara stabil dalam sebagian besar jaringan untuk mempertahankan fungsi homeostatis, COX-2 bersifat *inducible* dan ekspresinya dapat meningkat secara dramatis sebagai respons terhadap berbagai stimulus patologis seperti sitokin pro-inflamasi, growth factor, stress oksidatif, dan radiasi ultraviolet. Promotor gen COX-2 mengandung multiple regulatory elements termasuk NF-κB, AP-1, C/EBP, CREB, dan NFAT binding sites, yang memungkinkan regulasi transkripsi yang kompleks dan responsif terhadap berbagai sinyal seluler. Ekspresi COX-2 yang rendah atau tidak terdeteksi

pada kondisi normal dapat meningkat 10-80 kali lipat dalam kondisi inflamasi atau stress, dengan onset yang cepat (dalam 2-4 jam) dan durasi yang relatif singkat kecuali jika stimulus terus berlanjut. Lokalisasi subseluler COX-2 terutama pada retikulum endoplasma dan membran nukleus, berbeda dengan COX-1 yang predominan di retikulum endoplasma dan mitokondria.^{54,56}

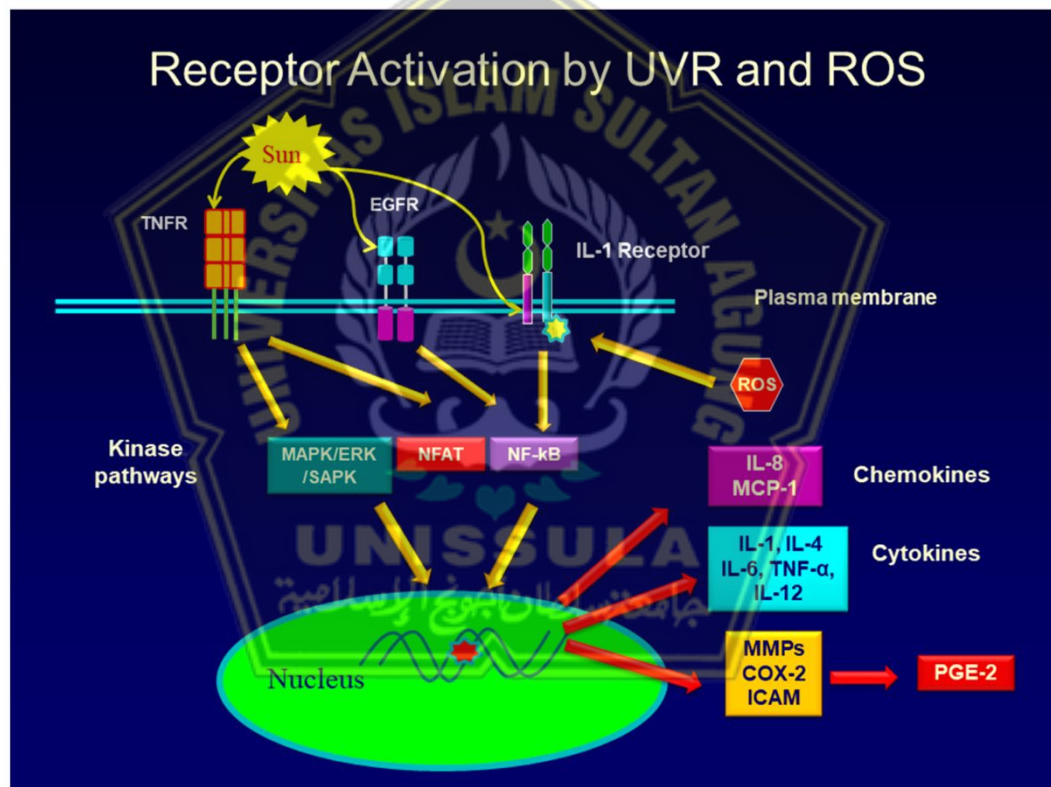
2.2.2. Regulasi Molekuler COX-2

Regulasi ekspresi COX-2 melibatkan multiple level kontrol yang kompleks, dimulai dari level transkripsi hingga post-translational modification. Pada level transkripsi, promotor COX-2 mengandung TATA box dan berbagai *cis-acting elements* yang merespons terhadap stimulus inflamasi.⁵⁷ *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) binding site pada posisi -447/-438 relatif terhadap *transcription start site* merupakan elemen regulasi yang paling krusial, memediasi induksi COX-2 oleh sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , dan *lipopolysaccharide* (LPS). *Activator protein-1* (AP-1) binding site pada posisi -285/-279 memediasi respons terhadap growth factor dan stress oksidatif melalui jalur MAPK. CCAAT/*enhancer-binding protein* (C/EBP) site berkontribusi pada regulasi basal dan inducible expression, sementara *cAMP response element-binding protein* (CREB) site memediasi aktivasi oleh jalur *adenylyl cyclase*/PKA.⁵⁷

Regulasi post-transcriptional COX-2 melibatkan stabilitas mRNA melalui *AU-rich elements* (ARE) pada *3' untranslated region* (UTR). *ARE-binding proteins* seperti *Human antigen R* dapat menstabilkan COX-2 mRNA dan meningkatkan translasi, sementara tristetraprolin (TTP) dan AUF1 dapat mendestabilkan mRNA dan menurunkan ekspresi protein. MicroRNA juga berperan dalam regulasi post-transcriptional, dengan miR-146a, miR-155, dan miR-16 dapat menghambat ekspresi COX-2 melalui binding pada complementary sequences di 3' UTR. Pada level post-translational, COX-2 dapat diregulasi melalui fosforilasi oleh berbagai kinase termasuk PKC, PKA, dan MAPK, yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim, stabilitas protein, dan interaksi dengan protein lain. Nitrosylation dan acetylation juga telah dilaporkan dapat memodulasi aktivitas COX-2, menunjukkan kompleksitas regulasi enzim ini pada multiple level.⁵⁷

Gambar 2.2. menjelaskan proses aktivasi COX-2 oleh UVB. Paparan UVA dan UVB pada penuaan ekstrinsik menyebabkan peningkatan NADPH oksidase yang meningkatkan produksi ROS. ROS ini mengaktifkan jalur sinyal pada keratinosit di epidermis dan fibroblas di dermis sehingga menstimulasi ekspresi gen inflamasi. Jalur yang diaktifkan berkaitan dengan reseptor permukaan seperti reseptor EGF, PGE-2, TNF-alpha, dan IL-1. UVR dapat mengaktifkan jalur ini melalui klusterisasi reseptor atau produksi

ROS yang memicu fosforilasi dan aktivasi ERK1/2 dan p38, kemudian mengaktifkan faktor transkripsi AP-1 yang meningkatkan aktivitas gen MMP-1. Peningkatan MMP-1 melalui aktivasi MAPK/AP-1 ini menyebabkan degradasi kolagen. Sebaliknya, aktivasi AP-1 juga menghambat sintesis kolagen tipe I dan III dengan mengganggu kompleks transkripsi yang diperlukan untuk ekspresi gen kolagen.⁵⁷



Gambar 2.2. Mekanisme Paparan UVB Mengaktifkan COX-2⁵⁷

2.2.3. Mekanisme COX-2 pada Collagen Loss di Paparan UVB

Paparan radiasi ultraviolet B (UVB) pada kulit menginduksi ekspresi COX-2 melalui cascade molekuler yang kompleks dan saling berinteraksi. Tahap inisiasi dimulai ketika foton UVB diserap

oleh chromophore dalam sel kulit, terutama DNA dan protein, menyebabkan kerusakan langsung dan pembentukan ROS.⁵⁸ ROS yang dihasilkan, termasuk superoxide anion, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil, bertindak sebagai *second messenger* yang mengaktifasi berbagai jalur transduksi sinyal. Jalur mitogen-activated protein kinase (MAPK) teraktivasi melalui oksidasi dan inaktivasi protein tyrosine phosphatases, yang menyebabkan aktivasi sustained dari ERK1/2, JNK, dan p38 MAPK. ERK1/2 yang teraktivasi memfosforilasi dan mengaktifasi Elk-1 dan CREB, sementara JNK memfosforilasi c-Jun dan p38 memfosforilasi ATF-2, yang secara kolektif membentuk dan mengaktifasi kompleks AP-1.^{36,53} Kompleks AP-1 yang terbentuk, terutama heterodimer c-Jun/c-Fos, bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan AP-1 response element pada promotor COX-2, menginduksi transkripsi gen secara langsung.⁵⁸

Bersamaan dengan aktivasi MAPK, ROS juga mengaktifasi jalur NF- κ B melalui fosforilasi I κ B kinase (IKK) complex. IKK yang teraktivasi memfosforilasi I κ B α pada residu serine 32 dan 36, menandai protein ini untuk ubiquitinasi dan degradasi proteasomal.⁵⁹ Degradasi I κ B α membebaskan NF- κ B subunit p65/p50 untuk bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan κ B response element pada promotor COX-2. Aktivasi simultan AP-1 dan NF- κ B menciptakan sinergisme yang meningkatkan proses transkripsi gen

cyclooxygenase-2 (COX-2) secara signifikan. Aktivasi ini menyebabkan peningkatan level mRNA yang dapat mencapai 10-50 kali lipat dalam 2-6 jam setelah paparan UVB. Jalur *protein kinase C* (PKC) juga teraktivasi oleh UVB melalui aktivasi phospholipase C dan produksi diacylglycerol, dengan PKC yang teraktivasi dapat memfosforilasi dan mengaktivasi berbagai target downstream termasuk MAPK dan transcription factor, serta secara langsung memfosforilasi COX-2 protein untuk meningkatkan aktivitas enzim.⁶⁰

COX-2 yang teraktivasi oleh paparan UVB mengkatalisis konversi asam arakidonat yang dibebaskan dari membran fosfolipid menjadi PGH₂, yang kemudian dikonversi oleh *prostaglandin E synthase* (PGES) menjadi *prostaglandin E2* (PGE₂).⁶⁰ Dalam konteks kulit yang terpapar UVB, *microsomal PGES-1* (mPGES-1) merupakan isoform yang paling relevan, karena ekspresinya juga dipapar oleh stimulus inflamasi dan secara fungsional coupled dengan COX-2. PGE₂ yang dihasilkan kemudian berikatan dengan empat sub tipe reseptor *prostanoid EP* (EP1-EP4) yang berbeda dalam profil coupling dengan G-protein dan downstream signaling. *EP1 receptor coupled* dengan Gq/11 protein dan mengaktivasi phospholipase C, meningkatkan inositol trisphosphate (IP₃) dan diacylglycerol (DAG) yang mengaktivasi protein kinase C dan meningkatkan konsentrasi kalsium intraseluler. EP2 dan EP4

receptor coupled dengan Gs protein dan mengaktivasi adenylyl cyclase, meningkatkan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) dan mengaktivasi protein kinase A (PKA).⁵⁷ EP3 receptor memiliki multiple splice variant yang dapat coupled dengan Gi/o protein atau Gq/11 protein, menunjukkan kompleksitas signaling yang tergantung pada tipe sel dan konteks fisiologis.⁵⁷

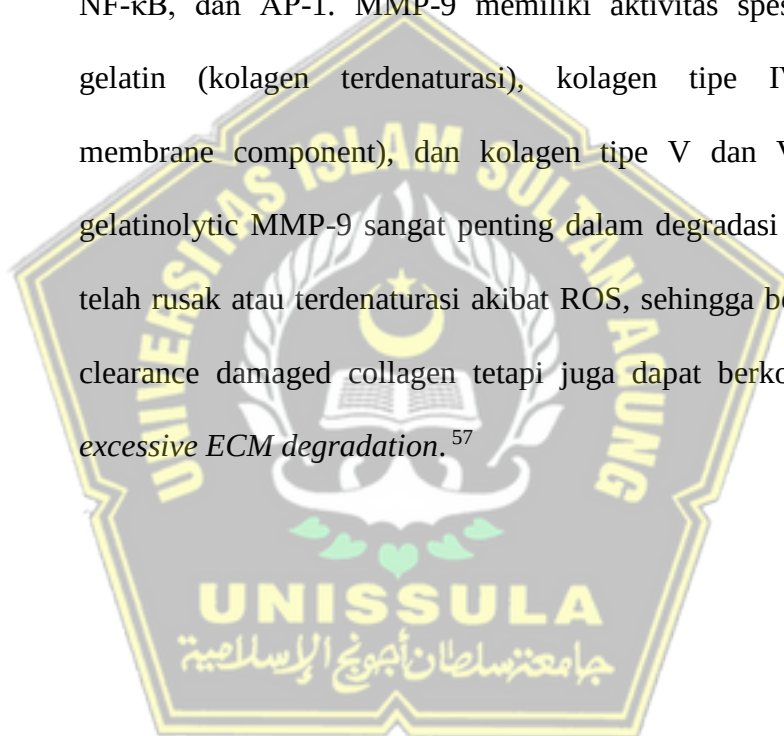
Aktivasi reseptor EP oleh PGE2 menginduksi berbagai efek downstream yang berkontribusi pada collagen loss. Jalur EP2/EP4-cAMP-PKA mengaktivasi CREB yang kemudian menginduksi transkripsi matrix metalloproteinases (MMPs), terutama MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 yang memiliki CREB binding site pada promotor mereka.⁶² PKA juga dapat memfosforilasi dan menginaktivasi *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK-3 β), yang menyebabkan stabilisasi dan akumulasi β -catenin. β -catenin yang terakumulasi dapat berikatan dengan *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) dan mengaktivasi transkripsi gen-gen yang terlibat dalam proliferasi dan migrasi sel, termasuk beberapa MMP. Jalur EP1-PKC dapat mengaktivasi MAPK cascade dan NF- κ B, menciptakan positive feedback loop yang memperpetual produksi COX-2 dan mediator inflamasi lainnya. PGE2 juga dapat menginduksi ekspresi vascular endothelial growth factor (VEGF) melalui aktivasi *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α), yang

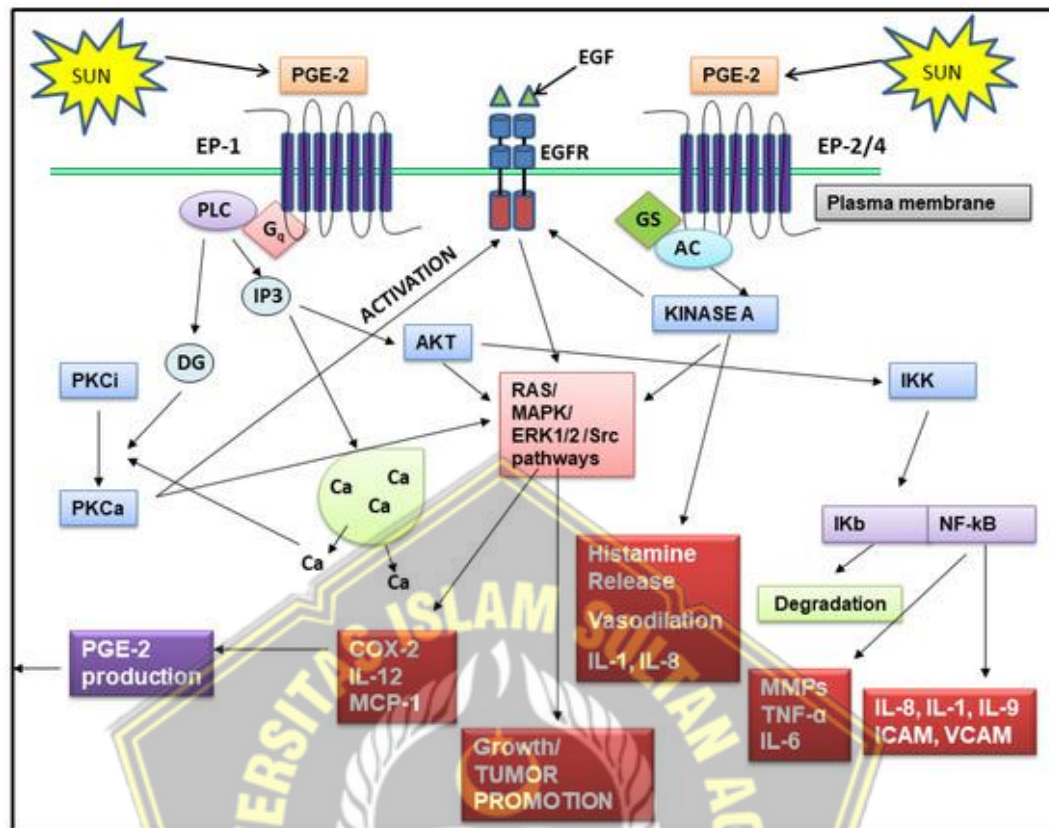
berkontribusi pada angiogenesis dan remodeling jaringan yang abnormal.⁵⁷

COX-2 mempengaruhi penurunan kolagen kulit terutama melalui induksi MMPs keluarga endopeptidase zinc-dependent yang bertanggung jawab atas degradasi berbagai komponen matriks ekstraselular. PGE2 yang dihasilkan oleh aktivitas COX-2 menginduksi ekspresi MMP-1 (*collagenase-1*) melalui jalur EP4-cAMP-PKA-CREB. MMP-1 memiliki spesifisitas tinggi terhadap kolagen fibrilar, terutama kolagen tipe I dan III yang merupakan komponen utama dermis.^{37,63} Enzim ini memotong triple helix kolagen pada single cleavage site yang spesifik, menghasilkan fragmen 3/4 dan 1/4 yang kemudian dapat didegradasi lebih lanjut oleh MMP lain seperti MMP-2 dan MMP-9.^{34,35,64} Induksi MMP-1 oleh PGE2 melibatkan aktivasi PKA yang memfosforilasi CREB pada Ser133, meningkatkan afinitas CREB terhadap *CREB-binding protein* (CBP) dan membentuk transcriptionally active complex pada *cAMP response element* (CRE) di promotor MMP-1.⁶⁵⁻⁶⁶

Gambar 2.3 menjelaskan mekanisme molekuler sinar UVB mengaktivasi Jalur Inflamasi COX-2 melalui PGE-2. PGE2 menginduksi ekspresi MMP-3 (*stromelysin-1*) melalui mekanisme yang serupa tetapi dengan target promotor yang berbeda. MMP-3 memiliki spektrum substrate yang lebih luas dibandingkan MMP-1, dapat mendegradasi kolagen tipe II, IV, V, IX, X, XI, serta berbagai

komponen ECM lainnya seperti fibronectin, laminin, elastin, dan proteoglycan. MMP-3 juga dapat mengaktivasi pro-MMP-1 dan pro-MMP-9 melalui proteolytic cleavage pada propeptide domain, menciptakan cascade proteolytic yang mengamplifikasi degradasi ECM.⁵⁷ Induksi MMP-9 (gelatinase B) oleh jalur COX-2/PGE2 terjadi melalui aktivasi multiple transcription factor termasuk CREB, NF- κ B, dan AP-1. MMP-9 memiliki aktivitas spesifik terhadap gelatin (kolagen terdenaturasi), kolagen tipe IV (basement membrane component), dan kolagen tipe V dan VII. Aktivitas gelatinolytic MMP-9 sangat penting dalam degradasi kolagen yang telah rusak atau terdenaturasi akibat ROS, sehingga berperan dalam clearance damaged collagen tetapi juga dapat berkontribusi pada *excessive ECM degradation*.⁵⁷





Gambar 2.3. Mekanisme Molekuler Sinar UVB mengaktivasi Jalur Inflamasi Melalui PGE-2⁵⁷

Paparan sinar matahari meningkatkan produksi prostaglandin E2 (PGE-2) yang kemudian mengaktifkan reseptor EP-1 dan EP-2/4 pada membran plasma sel kulit. Aktivasi reseptor EP-1 memicu jalur fosfolipase C (PLC) yang menghasilkan inositol trifosfat (IP3) dan diasilgliserol (DG), kemudian protein kinase Ca ($\text{PKC}\alpha$) dan $\text{PKC}\iota$ diaktifkan untuk meningkatkan produksi PGE-2, sehingga membentuk siklus umpan balik positif. Sementara itu, reseptor EP-2/4 mengaktifkan jalur GS, adenilat siklase (AC), dan kinase A yang bersama-sama mengaktifkan jalur RAS/MAPK/ERK1/2/Src serta protein kinase AKT. Aktivasi jalur ini menyebabkan pelepasan

histamin, vasodilatasi, serta ekspresi mediator inflamasi seperti IL-1 dan IL-8. Selain itu, jalur ini merangsang produksi enzim COX-2, sitokin IL-12, MCP-1, serta ekspresi matrix metalloproteinases (MMPs), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), IL-6, dan molekul adhesi seperti ICAM dan VCAM yang meningkatkan respons inflamasi dan degradasi matriks ekstraseluler. Jalur IKK-NF- κ B juga diaktifkan melalui degradasi penghambat I κ B, yang mengatur ekspresi gen proinflamasi. Semua proses ini berkontribusi pada inflamasi kronis, kerusakan jaringan, dan potensi promosi tumor, yang merupakan mekanisme utama dalam penuaan kulit akibat paparan sinar UV.⁵⁷

2.2.4. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ekspresi COX-2

Ekspresi COX-2 pada *collagen loss* akibat paparan UVB dimulai dari pembentukan ROS yang dihasilkan melalui aktivasi enzim NADPH oksidase.⁶⁷ ROS seperti superoksida dan hidrogen peroksida berfungsi sebagai *second messenger* yang mengaktifasi berbagai jalur transduksi sinyal konvergen yang mengarah pada induksi transkripsi gen COX-2. Promotor gen COX-2 kaya akan binding sites untuk faktor transkripsi seperti NF- κ B, AP-1, CREB, dan NF-IL6, yang diaktivasi melalui jalur sinyal yang dipicu oleh stres oksidatif.⁶⁸⁻⁶⁹

Jalur MAPK memainkan peran utama dalam regulasi COX-2 dengan mengaktifasi subfamili ERK1/2, JNK, dan p38 MAPK.

Aktivasi AP-1 yang berikatan dengan promotor COX-2, termasuk p38 MAPK menstabilkan mRNA COX-2 melalui fosforilasi AU-rich element-binding proteins, memperpanjang waktu paruh mRNA dan meningkatkan produksi protein COX-2.⁵⁶ ERK1/2 juga berkontribusi melalui aktivasi Elk-1 dan serum response element (SRE), sedangkan JNK menginduksi ekspresi COX-2 melalui aktivasi c-JUN dan kompleks AP-1, menciptakan kondisi optimal untuk ekspresi COX-2 yang tinggi dan berkelanjutan.⁵⁵

Aktivasi NF- κ B juga sangat esensial dalam regulasi COX-2, di mana ROS dan cytokine pro-inflamasi seperti TNF- α mengaktivasi I κ B kinase (IKK), menyebabkan degradasi I κ B dan translokasi NF- κ B ke nukleus.⁷ NF- κ B mengikat promotor COX-2 dan menginduksi transkripsi gen ini secara kuat. Penghambatan spesifik jalur NF- κ B dapat hampir sepenuhnya menghambat induksi COX-2 akibat UVB, menunjukkan dominasi jalur ini dalam regulasi COX-2. NF- κ B juga memperkuat produksi cytokine pro-inflammatory yang mengamplifikasi ekspresi COX-2 melalui mekanisme autocrine dan paracrine.⁵⁸

Jalur JAK2/STAT3 juga terlibat, di mana ROS dan cytokine mengaktifkan JAK2 yang memfosforilasi STAT3, kemudian STAT3 bertranslokasi ke nukleus untuk mengikat promotor COX-2 dan menginduksi ekspresinya. Jalur ini berperan dalam mempertahankan lingkungan inflamasi kronis dengan ekspresi gen pro-survival dan

pro-inflamasi yang mendukung ekspresi COX-2 secara sustained. Sinergisme STAT3 dengan NF- κ B dan AP-1 meningkatkan amplifikasi ekspresi COX-2.^{70,71}

Selain itu, cytokine pro-inflammatory IL-1 β , TNF- α , dan IL-6 yang dihasilkan pasca paparan UVB merupakan inducer sekunder yang memperkuat ekspresi COX-2 melalui aktivasi jalur NF- κ B, MAPK, dan JAK/STAT. IL-1 β mengaktifkan jalur MyD88-IRAK-TRAF6, TNF- α mengaktifkan jalur TRADD-TRAF2-RIP dan ASK1, sementara IL-6 mengaktifkan jalur JAK/STAT.⁷²⁻⁷⁴ Jaringan cytokine ini menciptakan lingkungan inflamasi yang mendukung ekspresi COX-2 jangka panjang.

Salah satu mekanisme unik dalam regulasi COX-2 adalah positive feedback loop oleh *prostaglandin E2* (PGE2), produk enzim COX-2 sendiri. PGE2 berikatan dengan reseptor EP pada permukaan sel dan mengaktifkan *adenylyl cyclase*, meningkatkan cAMP dan mengaktifkan *protein kinase A* (PKA).⁷⁵ PKA memfosforilasi CREB yang menginduksi promotor gen termasuk COX-2 dan MMPs, memperkuat ekspresi dan produksi PGE2 serta degradasi kolagen berkelanjutan yang sulit diputus tanpa intervensi.⁷⁵

Regulasi post-transcriptional juga penting, di mana p38 MAPK menstabilkan mRNA COX-2 dengan memfosforilasi ARE-binding proteins, seperti mencegah degradasi mRNA oleh *tristetraprolin* (TTP) dan meningkatkan aktivitas stabilizer mRNA seperti HuR,

sehingga ekspresi protein COX-2 dapat berlangsung cepat dan berkesinambungan.⁷⁵ Jalur PI3K/AKT turut berkontribusi dengan mengaktivasi IKK dan memperkuat NF- κ B, serta mempengaruhi jalur mTOR untuk regulasi translasi protein COX-2. Perubahan epigenetik seperti demetilasi DNA dan modifikasi histon pada promotor COX-2 akibat paparan UVB kronis juga meningkatkan aksesibilitas chromatin bagi faktor transkripsi, memperkuat ekspresi COX-2 dalam jangka panjang dan menciptakan "memory" inflamasi pada kulit yang pernah terpapar UVB.^{7,76}

2.3. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)

2.3.1. Definisi MSCs

Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adipositas, dan neurosit. Mesenchymal stem cell dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat.⁷⁷ Secara umum, MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotipe, MSCs yang diisolasi dari tikus, dimana MSCs tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat osteogenik.⁷⁸

2.3.2. Peran MSCs

Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk bersifat pro-inflamasi atau bersifat anti-inflamasi. MSCs berperan dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Hal ini menyebabkan proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi selesai, MSCs akan berubah peran bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengeksresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi.⁷⁹⁻⁸⁰

2.3.3. Konsep *Small Molecule Growth Factor* MSC

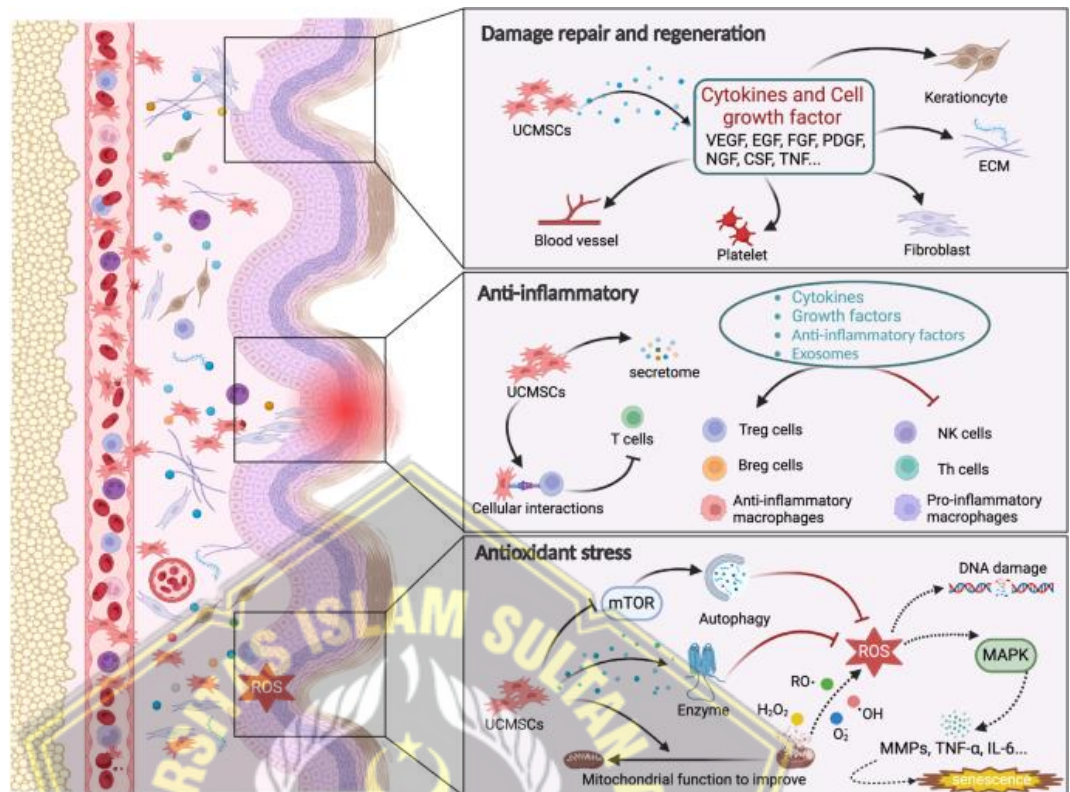
Terminologi fungsional MSC didasarkan pada kemampuannya dalam menskresi berbagai *soluble molecule* secara parakrin. Konsep parakrin adalah komunikasi MSC dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepaskan oleh MSC. Secara spesifik, konsep *small molecule growth factor* MSC didasarkan pada⁸¹:

1. Kompleksitas teknik isolasi MSC

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

2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat

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



Gambar 2.4. Peran MSCs pada Proses Regenerasi di Kulit Karena Paparan Sinar UVB⁸²

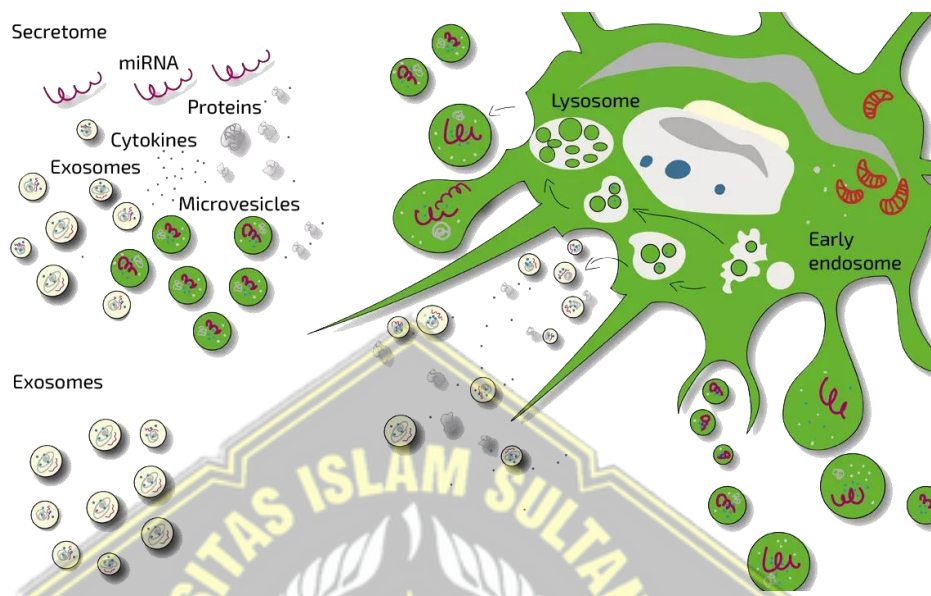
3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi

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

2.3.4. Induksi *Small Molecule* dan *Exosome* MSC

Peranan *small molecule* dan *exosome* MSC ini, sehingga memunculkan berbagai upaya dalam menghasilkan *small molecule* dan *exosome* secara *in-vitro*. Secara spesifik induksi *small molecule* growth factor MSC dapat dibagi menjadi 2, yaitu menginduksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi, secara teoritis, MSC yang diaktivasi sebelumnya oleh TNF- α dapat melepas berbagai molekul anti-inflamasi. MSC yang diinkubasi dalam keadaan hipoksia akan melepaskan berbagai molekul pro-regenerasi. Hal ini memunculkan teori *hypoxic preactivated MSC-induced soluble molecule* yaitu berbagai molekul terlarut dalam medium dilepas MSC yang mengalami hipoksia. Kondisi hipoksia pada MSCs diketahui dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 sebagai *small molecule* dan ekspresi berbagai macam antioksidan, seperti GPX, superoxide dismutase (SOD)1, SOD2, catalase (CAT) dan sirtuin (SIRT)1 dan 3 yang terakumulasi di dalam *exosome*. Produksi IL-10 oleh MSCs dapat menghambat faktor transkripsi nuclear factor kappa B yang merupakan pemicu overekspresi ROS. Sisi lain, berbagai macam antioksidan yang diekspresikan secara langsung oleh MSCs melalui *exosome*, seperti GPX mampu mengaktivasi faktor transkripsi NRF2 yang berujung pada peningkatan ekspresi antioksidan. Sisi lain, berbagai miRNA yang terkandung dalam

exosome MSCs hypoxia juga mampu berperan dalam inhibisi stres oksidatif, seperti miR21, miR-22-3p dan miR-215-5p.⁸³



Gambar 2.5. Komponen yang dikeluarkan oleh MSCs⁶⁰

2.3.5. *Exosome* Hypoxia MSCs (EH-MSCs)

Exosome merupakan *extracellular vesicles* (EVs) berukuran 30-150 nm yang disekresi oleh hampir semua jenis sel. Biogenesis *exosome* dimulai dari invaginasi membran endosom awal membentuk *multivesicular bodies* (MVBs).⁸³ Vesikula intraluminal dalam MVBs kemudian dilepaskan ke ruang ekstraseluler melalui fusi dengan membran plasma, membentuk *exosome*. Proses ini melibatkan kompleks *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) dan mekanisme independen ESCRT.⁸³ *Exosome* mengandung berbagai biomolekul, termasuk protein, lipid, mRNA, microRNA (miRNA), dan molekul bioaktif lainnya. Membran *exosome* kaya akan tetraspanin seperti CD9, CD63, dan CD81 yang

menjadi penanda karakteristik exosome.⁸³ Kandungan molekuler exosome bersifat dinamis dan dipengaruhi oleh kondisi mikro lingkungan sel MSCs, termasuk kondisi hipoksia. Exosome berfungsi sebagai mediator komunikasi interseluler dengan mentransfer kargo molekulernya ke sel target melalui endositosis, fusi membran, atau interaksi reseptor-ligan.

Exosome yang berasal dari MSCs dalam kondisi hipoksia (EH-MSCs) memiliki komposisi molekuler yang berbeda dibandingkan exosome dari MSCs normoksia. Kondisi hipoksia mengubah profil miRNA dalam exosome, dengan peningkatan ekspresi miRNA pro-angiogenik seperti miR-21, miR-126, miR-210, dan miR-146a. MicroRNA ini berperan dalam regulasi angiogenesis, proliferasi sel, dan proteksi terhadap apoptosis.⁸³

Kandungan protein dalam EH-MSCs juga mengalami modifikasi yaitu terjadi peningkatan ekspresi faktor pertumbuhan seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), dan *transforming growth factor-beta* (TGF- β). Protein-protein ini berperan penting dalam angiogenesis, proliferasi fibroblas, dan sintesis matriks ekstraseluler. Disisi lain EH-MSCs mengandung *matrix metalloproteinase inhibitors* (TIMPs) yang dapat memodulasi aktivitas enzim degradasi matriks.⁸³

Membran exosome mengandung ceramide, sphingomyelin, dan kolesterol yang berperan dalam stabilitas membran dan internalisasi exosome ke sel target. Beberapa studi melaporkan bahwa EH-MSCs juga mengandung molekul sinyal seperti *prostaglandin E2* (PGE2) dan *growth differentiation factor 15* (GDF15) yang memiliki efek anti-inflamasi dan protektif terhadap stress oksidatif.⁸³

2.3.6. *Peran Exosome Hypoxia MSCs (EH-MSCs) dalam Mencegah Collagen Loss*

Exosome hypoxia MSCs memberikan efek biologis pada sel kulit melalui beberapa mekanisme molekuler dengan transfer miRNA dari exosome ke sel target sehingga mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam jalur pensinyalan seluler. MiR-21 yang terkandung dalam Eh-MSCs dapat menghambat ekspresi gen pro-apoptotik dan meningkatkan proliferasi fibroblas dermis.⁸² MiR-210, yang merupakan miRNA dalam respons hipoksia, dapat meningkatkan angiogenesis dan survival sel dalam kondisi stress. Protein bioaktif VEGF pada EH-MSCs berikatan dengan reseptor VEGFR pada sel endotel dan fibroblas, mengaktifkan jalur PI3K/Akt dan MAPK/ERK yang meningkatkan proliferasi sel dan produksi matriks ekstraseluler.⁸² TGF- β yang dibawa exosome mengaktifkan jalur Smad2/3, meningkatkan ekspresi gen kolagen tipe I dan III pada fibroblas. Aktivasi jalur TGF- β /Smad ini merupakan mekanisme dalam stimulasi sintesis kolagen.⁸³ EH-MSCs juga

memiliki kemampuan imunomodulasi dan anti-inflamasi. Exosome menghambat aktivasi sel imun dan menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6. Penurunan inflamasi ini penting dalam mencegah degradasi kolagen, karena sitokin pro-inflamasi diketahui meningkatkan ekspresi *matrix metalloproteinases* (MMPs) yang mendegradasi kolagen. Selain itu, komponen exosome seperti HIF-1 α dan faktor-faktor terkait hipoksia dapat mentransfer fenotip protektif terhadap stress oksidatif ke sel target.⁸²

MicroRNA dalam EH-MSCs, khususnya miR-21 dan miR-146a, dapat menghambat aktivasi jalur MAPK dengan menargetkan gen-gen dalam jalur ini. Studi menunjukkan bahwa miR-21 dapat menurunkan ekspresi MMP-9 dan MMP-3 pada fibroblas yang terpapar UVB.⁸³ Penghambatan jalur ini mengurangi degradasi kolagen oleh enzim kolagenase. Disisi lain, stimulasi sintesis kolagen melalui aktivasi jalur TGF- β /Smad. Aktivasi jalur ini meningkatkan ekspresi gen COL1A1 dan COL3A1 yang mengkode kolagen tipe I dan III. Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa perlakuan dengan exosome MSCs meningkatkan ekspresi mRNA dan protein kolagen pada fibroblas dermis. Efek stimulasi sintesis kolagen ini lebih kuat pada exosome dari MSCs hipoksia dibandingkan normoksia, kemungkinan karena kandungan TGF- β dan miRNA pro-fibrotik yang lebih tinggi.⁸³

EH-MSCs meningkatkan ekspresi enzim antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD), *catalase*, dan *glutathione peroxidase* melalui transfer mRNA dan miRNA. Peningkatan kapasitas antioksidan sel mengurangi akumulasi ROS akibat paparan UVB, sehingga menurunkan aktivasi jalur MAPK dan kerusakan oksidatif. Beberapa studi menunjukkan bahwa exosome MSCs dapat meningkatkan perbaikan DNA melalui modulasi jalur DNA damage response, meskipun mekanisme spesifiknya masih perlu penelitian lebih lanjut.⁸²

Exosome MSCs menghambat produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α pada keratinosit dan fibroblas yang terpapar UVB. Penurunan sitokin ini mengurangi stimulasi ekspresi MMPs dan menghambat degradasi kolagen. Selain itu, efek anti-inflamasi ini juga melindungi fibroblas dari apoptosis dan senescence prematur akibat paparan UVB kronis. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa exosome MSCs dapat memodulasi polarisasi makrofag dari fenotip M1 pro-inflamasi ke M2 anti-inflamasi, berkontribusi terhadap resolusi inflamasi dan regenerasi jaringan.⁸²

2.4. Kolagen

2.4.1. Struktur dan Fungsi Kolagen dalam Kulit

Kolagen merupakan protein struktural utama yang menyusun matriks ekstraselular kulit, terdiri dari sekitar 25-30% total protein

tubuh dan hingga 70-80% dry weight dermis. Kolagen kulit didominasi oleh kolagen tipe I (80-85%) dan kolagen tipe III (10-15%), dengan sejumlah kecil kolagen tipe V, VI, VII, XII, dan XIV yang berperan dalam organisasi dan stabilitas fibrillar structure. Struktur molekuler kolagen terdiri dari triple helix yang dibentuk oleh tiga polypeptide chain (α -chain), masing-masing mengandung sekitar 1000 asam amino dengan sequence Gly-X-Y berulang, di mana X seringkali proline dan Y seringkali hydroxyproline. Glisin yang berukuran kecil memungkinkan tight packing dari tiga α -chain, sementara proline dan hydroxyproline memberikan stabilitas termal dan struktur rigid pada triple helix. Hydroxylation proline oleh prolyl 4-hydroxylase menggunakan vitamin C, α -ketoglutarate, dan iron sebagai cofactor sangat krusial untuk stabilitas kolagen, karena 4-hydroxyproline dapat membentuk additional hydrogen bond yang menstabilkan triple helix structure.⁸⁴

Biosintesis kolagen melibatkan proses kompleks yang dimulai di retikulum endoplasma dengan translasi mRNA menjadi pre-pro-collagen, yang kemudian mengalami signal peptide cleavage menjadi pro-collagen. Pro-collagen α -chain mengalami extensive post-translational modification termasuk hydroxylation proline dan lysine residues oleh prolyl 4-hydroxylase dan lysyl hydroxylase, glycosylation hydroxylysine residues, dan formation disulfide bond dalam C-terminal propeptide domain.^{17,85} Triple helix assembly

terjadi melalui nucleation dari C-terminal propeptide domain dan propagasi ke arah N-terminal dalam zipper-like fashion. Pro-collagen yang telah terbentuk disekresikan ke ruang ekstraselular melalui constitutive secretory pathway, di mana N-terminal dan C-terminal propeptide dipotong oleh *specific proteinase* (ADAMTS-2, ADAMTS-3, ADAMTS-14 untuk N-terminal; BMP-1, *tolloid-like proteinase* untuk C-terminal) menghasilkan mature collagen molecule. Mature collagen kemudian undergo self-assembly menjadi collagen fibril melalui specific intermolecular interaction, dengan *cross-linking* oleh *lysyl oxidase* dan *lysyl hydroxylase* yang mengkatalisis formation aldol condensation dan *pyridinoline/pyrrole cross-link* yang memberikan tensile strength pada collagen fiber.^{86,87}

2.4.2. Homeostasis Kolagen dan Faktor Regulasi

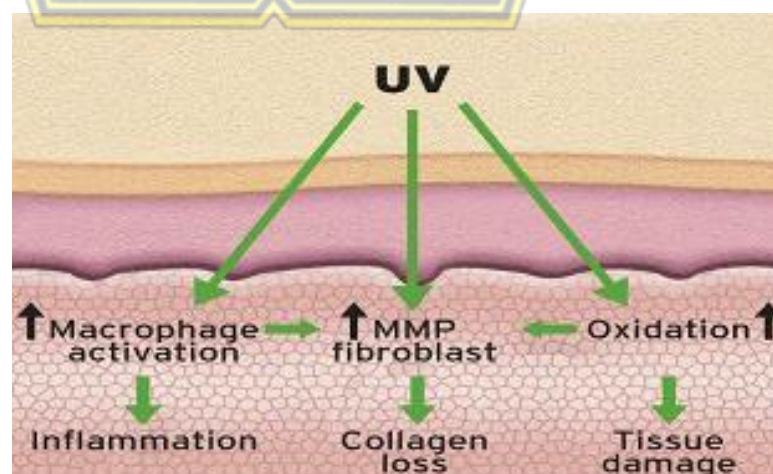
Homeostasis kolagen dalam kulit diatur melalui keseimbangan dinamis antara sintesis dan degradasi yang melibatkan multiple cellular dan molecular mechanism. Fibroblas merupakan sel utama yang bertanggung jawab atas sintesis kolagen, dengan regulasi yang kompleks oleh growth factor, cytokine, mechanical stress, dan microenvironment. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) merupakan stimulator utama sintesis kolagen melalui aktivasi Smad2/3 *signaling pathway* yang menginduksi transkripsi COL1A1 dan COL1A3 gene. TGF- β juga menginduksi differentiation fibroblas menjadi myofibroblast yang memiliki kapasitas sintesis

kolagen lebih tinggi dan dapat memberikan mechanical tension yang diperlukan untuk proper *collagen fiber organization*. *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), dan *connective tissue growth factor* (CTGF) juga berkontribusi pada stimulasi sintesis kolagen melalui jalur signaling yang berbeda tetapi komplementer.^{88,90}

Degradasi kolagen diatur terutama oleh MMPs yang aktivitasnya dikontrol oleh *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs) dan aktivasi dari pro-enzyme form. MMP-1, MMP-8, dan MMP-13 memiliki kemampuan unik untuk memotong native fibrillar collagen pada specific site, sementara MMP-2 dan MMP-9 mendegradasi gelatin dan collagen yang telah terdenaturasi.^{26,37} Keseimbangan antara MMPs dan TIMPs sangat krusial dalam maintaining collagen homeostasis, dengan TIMP-1 dan TIMP-2 sebagai inhibitor utama yang mengregulasi *collagenolytic* dan *gelatinolytic activity*. *Mechanical stress* juga berperan penting dalam regulasi collagen turnover melalui mechanotransduction pathway yang melibatkan integrin, focal adhesion kinase, dan downstream signaling yang dapat menginduksi atau menghambat expression gene yang terlibat dalam collagen metabolism. *Age-related changes* dalam mechanical properties kulit, kadar hormon, dan antioxidant capacity juga mempengaruhi collagen homeostasis dan berkontribusi pada *age-related collagen loss*.^{11,91}

2.4.3. Patofisiologi *Collagen Loss*

Collagen loss merupakan proses patologis yang terjadi ketika keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen terganggu, dengan degradation rate melebihi synthesis rate, mengakibatkan net reduction dalam collagen content dan perubahan dalam quality kolagen yang tersisa. Faktor-faktor yang berkontribusi pada collagen loss meliputi intrinsic aging (chronoaging) dan extrinsic aging (photoaging), dengan photoaging akibat paparan UV menjadi kontributor utama pada area kulit yang terpapar. Chronoaging ditandai oleh penurunan progresif dalam fibroblast proliferation, synthetic capacity, dan responsiveness terhadap growth factor, serta peningkatan *senescence-associated β -galactosidase activity* dan *inflammatory mediator production*.⁹²⁻⁹⁴ Perubahan hormonal, terutama penurunan estrogen pada menopause, juga berkontribusi signifikan pada *collagen loss* melalui penurunan TGF- β signaling dan peningkatan MMP activity.⁹⁵⁻⁹⁶



Gambar 2.6. UVB menginduksi *Collagen loss*⁷⁶

Photoaging akibat paparan chronic UV radiation merupakan penyebab utama premature collagen loss, dengan karakteristik yang berbeda dari chronoaging. UV radiation menginduksi immediate dan delayed response yang mengakibatkan collagen degradation melalui multiple mechanism. Immediate response meliputi ROS generation, DNA damage, dan activation inflammatory cascade yang menginduksi MMPs dalam hitungan jam setelah paparan. Delayed response meliputi alteration dalam gene expression profile yang persistent, dengan upregulation MMPs dan downregulation collagen synthesis gene yang dapat berlangsung selama sehari-hari hingga berminggu-minggu. Chronic UV exposure juga mengakibatkan accumulation abnormal elastic fiber (solar elastosis) yang menggantikan normal collagen structure, serta thickening stratum corneum dan epidermal hyperplasia yang mengganggu normal dermal-epidermal communication. *Advanced glycation end products* (AGEs) yang formation-nya dipercepat oleh UV exposure dan oxidative stress juga berkontribusi pada collagen loss melalui cross-linking abnormal yang mengubah mechanical properties kolagen dan meningkatkan susceptibility terhadap proteolytic degradation.⁹⁷

2.5. Hyaluronic Acid

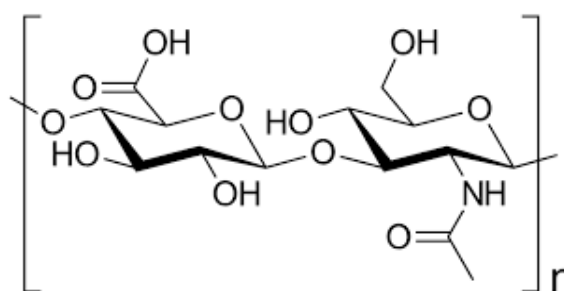
2.5.1. Definisi

Asam hialuronat (HA) adalah polisakarida alami yang termasuk dalam keluarga besar glikosaminoglikan (GAG). HA

berperan sebagai komponen utama matriks ekstraseluler di jaringan ikat, termasuk kulit, di mana fungsi utamanya adalah menstabilkan struktur interseluler, menjaga kelembapan, dan membentuk matriks fluida sebagai tempat pengikatan kolagen serta serat elastik. Secara alami, HA juga terdapat dalam cairan sendi, mata, dan jaringan lain pada tubuh manusia. Sinergi ini sangat penting karena seiring pertambahan usia, jumlah HA di kulit menurun, sehingga terjadi peningkatan kerutan maupun penurunan elastisitas kulit.⁹⁸

2.5.2. Struktur Molekul HA

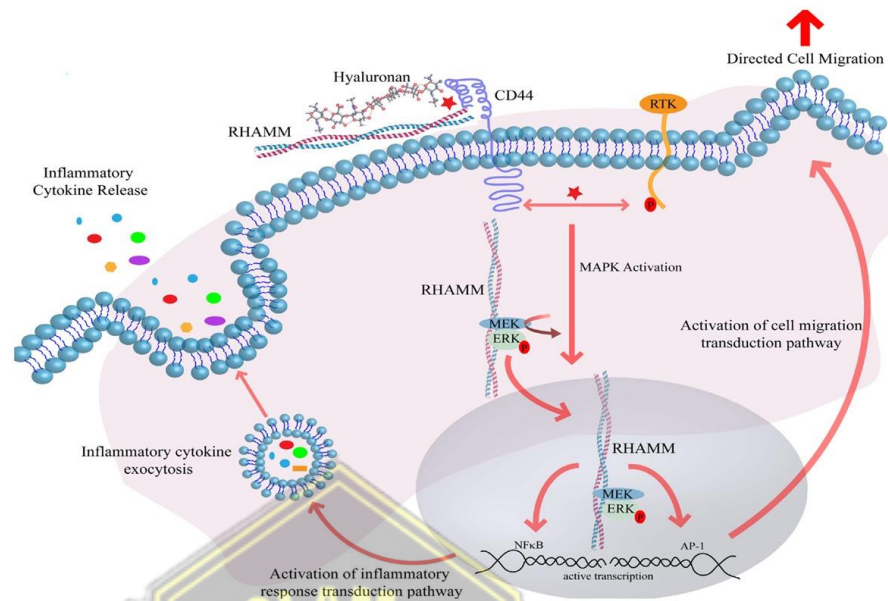
HA tersusun dari rantai panjang berulang dari dua monosakarida: asam D-glukuronat dan N-asetil-D-glukosamin, yang terhubung melalui ikatan β -glikosidik (Gambar 2.7). Struktur polimer linier ini memberikan kemampuan pada HA untuk mengikat air dalam jumlah besar dan menahan kelembapan kulit. HA tersedia dalam bentuk berat molekul tinggi (HMW-HA) dan rendah (LMW-HA), masing-masing memberikan efek biologis berbeda. Struktur HA yang unik di antara GAG lain karena tidak berikatan dengan protein inti dan tidak mengalami modifikasi pasca-sintesis.⁹⁹



Gambar 2.7. Struktur Kimia HA

2.5.3. Mekanisme Molekuler HA dalam Menginduksi Produksi Kolagen

Asam hialuronat meningkatkan kolagen kulit melalui beberapa mekanisme molekuler yang saling terkait. HA berperan dalam hidrasi dan viscoelastisitas dengan kemampuannya mengikat dan mempertahankan kelembapan tinggi pada matriks ekstraseluler, sehingga mendukung proses penyembuhan luka serta memperbaiki jaringan kulit yang rusak. Selain itu, HA berinteraksi dengan sel fibroblas dengan merangsang migrasi dan proliferasi fibroblas, yang merupakan sel utama dalam produksi kolagen tipe I dan III yang penting untuk kesehatan kulit. HA juga membantu menstabilkan matriks ekstraseluler dengan menata ulang matriks granulasi sehingga serat kolagen baru dapat tersusun dengan lebih baik dan terorganisir. Selanjutnya, HA mengurangi degradasi kolagen dengan menurunkan aktivitas enzim matrix metalloproteinase (MMP), yang biasanya meningkat akibat stres oksidatif, seperti paparan UVB, sehingga membatasi kerusakan kolagen. Terakhir, HA memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi yang efektif dalam meredam pembentukan radikal bebas serta merangsang produksi sitokin antiinflamasi seperti IL-10, yang secara keseluruhan mempercepat proses pemulihan jaringan dan mencegah kerusakan kolagen lebih lanjut.⁹⁹⁻¹⁰¹



Gambar 2.8. Mekanisme HA mempengaruhi sitokin inflammasi melalui reseptor CD44⁸¹

2.5.4. Aplikasi HA pada Kulit

Aplikasi HA dalam bidang dermatologi sangat beragam, secara topikal, HA banyak digunakan dalam bentuk krim, serum, atau gel yang berfungsi untuk meningkatkan kelembapan permukaan kulit dan mendukung proses penyembuhan regeneratif. Selain itu, HA juga diaplikasikan dalam bentuk injeksi sebagai filler dengan berat molekul tinggi yang digunakan untuk mengisi kerutan serta langsung meningkatkan struktur kolagen kulit. Pada kasus luka, HA dimanfaatkan dalam produk dressing atau inovasi lain untuk mempercepat penyembuhan dan merangsang regenerasi kolagen di area yang terluka. Mengenai dosis, produk topikal biasanya mengandung HA dengan konsentrasi antara 0,2% hingga 2%.⁹⁹ Sedangkan untuk penggunaan injeksi filler, dosis dan interval

pemberian disesuaikan dengan indikasi klinis dan pertimbangan dokter yang menangani pasien. Produk HA dengan molekul lebih kecil digunakan untuk penetrasi yang lebih dalam ke lapisan kulit, sementara HA dengan berat molekul tinggi lebih efektif untuk menjaga hidrasi pada permukaan kulit.¹⁰²



BAB III

KERANGKA TEORI

3.1. Kerangka Teori

Paparan radiasi ultraviolet B (UVB) pada kulit menyebabkan *collagen loss* akibat kerusakan DNA langsung pada keratinosit dan fibroblas dermis melalui pembentukan *cyclobutane pyrimidine dimers* dan 6-4 *photoproducts*.¹⁰³ Kerusakan DNA ini mengaktifasi respons stres seluler yang memicu peningkatan aktivitas enzim NADPH oksidase, terutama isoform NOX1, NOX2, dan NOX4.^{104,105} Aktivasi NADPH oksidase mengkatalisis reduksi oksigen molekuler menjadi superoksida dan hidrogen peroksida, yang selanjutnya bereaksi membentuk radikal hidroksil melalui reaksi Fenton, menciptakan kondisi stres oksidatif dengan akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) yang masif di jaringan kulit.^{106,107}

ROS yang terbentuk berfungsi sebagai *second messenger* yang mengaktifasi berbagai jalur seperti *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).³⁶ MAPK teraktivasi melalui oksidasi protein tyrosine phosphatases yang menyebabkan aktivasi Ras-GTP, kemudian mengaktifasi cascade Raf-MEK-ERK. Parallel dengan ini, ROS juga mengaktifasi JNK dan p38 MAPK melalui jalur MKK4/7 dan MKK3/6.^{36,59} Aktivasi ketiga subfamili MAPK ini (ERK, JNK, p38) kemudian memfosforilasi berbagai target downstream, dengan JNK secara spesifik memfosforilasi c-JUN pada residu Ser63 dan Ser73, sementara p38 memfosforilasi ATF-2.^{44,68}

Fosforilasi ini meningkatkan stabilitas dan aktivitas transkripsi kompleks *activator protein-1* (AP-1) yang terbentuk dominan dalam respons UVB.¹⁰⁸

Jalur *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/AKT juga teraktivasi melalui inaktivasi PTEN oleh oksidasi ROS. PTEN yang terinaktivasi menyebabkan akumulasi PIP3 yang mengaktivasi PDK1 dan AKT.⁵¹ AKT yang teraktivasi kemudian menginduksi ekspresi *indoleamine 2,3-dioxygenase 1* (IDO1) yang berperan dalam modulasi respons imun lokal dan perpetuasi inflamasi kronis. Jalur ketiga yang teraktivasi adalah JAK2/STAT3, di mana ROS menginduksi aktivasi JAK2 baik melalui *cytokine autocrine loop* maupun *direct oxidative activation*. JAK2 yang teraktivasi memfosforilasi STAT3 pada Tyr705, menyebabkan dimerisasi dan translokasi STAT3 ke nukleus untuk mengaktivasi transkripsi gen-gen *pro-inflammatory* dan *pro-survival*.^{51,109}

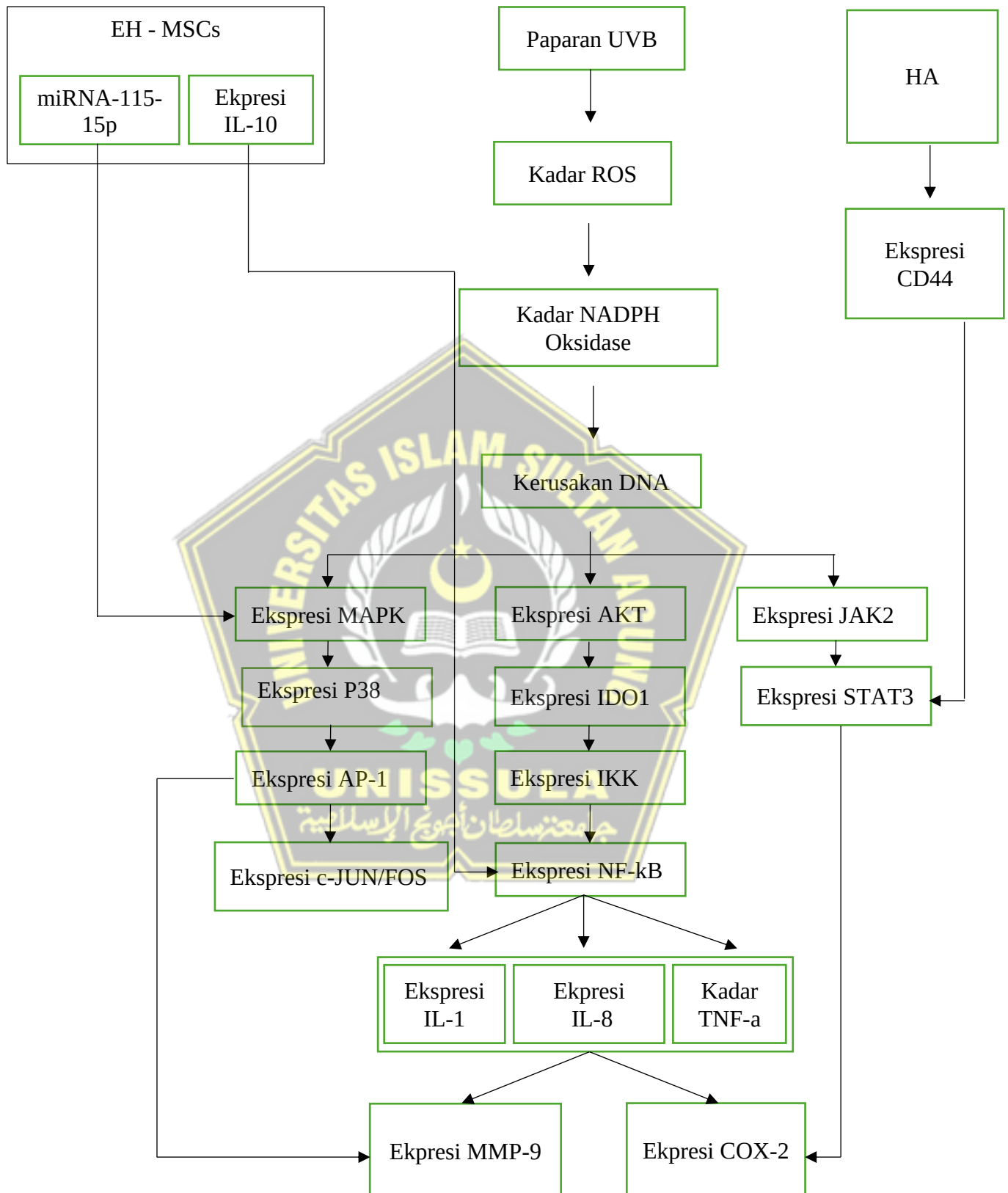
Aktivasi NF- κ B melalui jalur I κ B kinase (IKK) menjadi komponen penting untuk bertranslokasi ke nukleus. Aktivasi simultan AP-1, STAT3, dan NF- κ B menciptakan lingkungan transkripsi yang sangat kondusif untuk produksi mediator inflamasi.^{58,110} Ketiga faktor transkripsi ini menginduksi ekspresi *cytokine pro-inflammatory* secara masif, termasuk *interleukin-1* (IL-1) yang berfungsi sebagai ampliflier respons inflamasi dan inducer MMPs, *interleukin-8* (IL-8) yang berperan sebagai chemoattractant dan aktivator MMPs melalui jalur CXCR1/2, dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) yang memiliki efek pleiotropic dalam menginduksi apoptosis keratinosit rusak dan mengamplifikasi aktivasi NF- κ B secara autocrine.^{111,112}

Produksi cytokine pro-inflammatory ini kemudian menginduksi ekspresi enzim proteolitik utama yang bertanggung jawab atas degradasi kolagen. *Matrix metalloproteinase-9* (MMP-9), yang memiliki promotor mengandung binding sites untuk AP-1, NF- κ B, dan STAT3, terekspresi secara masif dan disekresikan ke ruang ekstraselular.^{111,112} MMP-9 sebagai gelatinase B memiliki aktivitas spesifik terhadap kolagen tipe IV, V, VII, X, XI, dan gelatin (kolagen terdenaturasi), sehingga secara langsung mendegradasi komponen basement membrane dan kolagen yang telah rusak akibat ROS. *Cyclooxygenase-2* (COX-2) juga teraktivasi melalui jalur yang sama, mengkatalisis konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin H₂, prekursor PGE₂.^{56,113} PGE₂ yang dihasilkan mengaktivasi reseptor EP yang *coupled dengan adenyl cyclase*, meningkatkan cAMP dan mengaktivasi protein kinase A yang selanjutnya memfosforilasi CREB untuk menginduksi ekspresi MMPs tambahan, menciptakan *positive feedback loop* yang memperpetual degradasi kolagen.^{11,57}

Exosome yang dihasilkan oleh *mesenchymal stem cells* (MSCs) yang dikondisikan dalam hypoxia menunjukkan potensi dalam mengatasi collagen loss akibat UVB.¹¹ Exosome hipoksia MSCs mengandung miRNA spesifik seperti miR-155-15p dan 146a yang mentarget TRAF6 dan IRAK1 dalam jalur TLR/IL-1R, miR-21 yang mentarget PDCD4 dan PTEN untuk mengaktivasi jalur survival, dan miR-155 yang memiliki efek anti-inflammatory. Selain miRNA, secretome juga mengandung IL-10 yang mengaktivasi JAK1/STAT3 pathway dengan program transkripsi berbeda

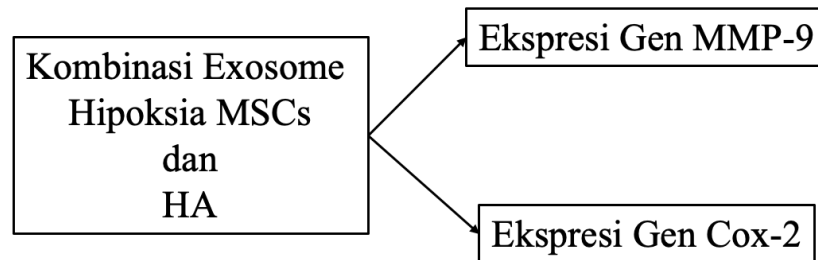
yang menginduksi SOCS3 untuk menghambat signaling *cytokine pro-inflammatory*, serta TGF- β yang mengaktivasi jalur Smad2/3 untuk menginduksi transkripsi kolagen tipe I dan III dan *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs).

Hyaluronic acid (HA) sebagai komponen terapi kombinasi bekerja melalui mekanisme yang komplementer dengan exosome. HA berikatan dengan CD44 receptor pada permukaan fibroblas, mengaktivasi jalur JAK2/STAT3 dengan program transkripsi yang mendukung tissue repair dan angiogenesis. CD44-mediated activation juga mengaktivasi Rho GTPase pathway yang menginduksi reorganisasi cytoskeleton dan aktivasi *serum response factor* (SRF), yang kemudian menginduksi ekspresi *connective tissue growth factor* (CTGF) untuk stimulasi sintesis kolagen dan deposisi ECM. HA juga menginduksi ekspresi TIMP-1 melalui jalur CD44/JAK2/STAT3, yang secara spesifik menghambat aktivitas MMP-9 dan MMP-1 untuk mengurangi degradasi kolagen. Meskipun HA terutama meningkatkan proliferasi fibroblas dan sintesis TIMP-1, efek anti-inflamasinya tidak sekuat secretome MSCs, sehingga monoterapi HA cenderung mengalami relaps *collagen loss* jika dihentikan.



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 kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

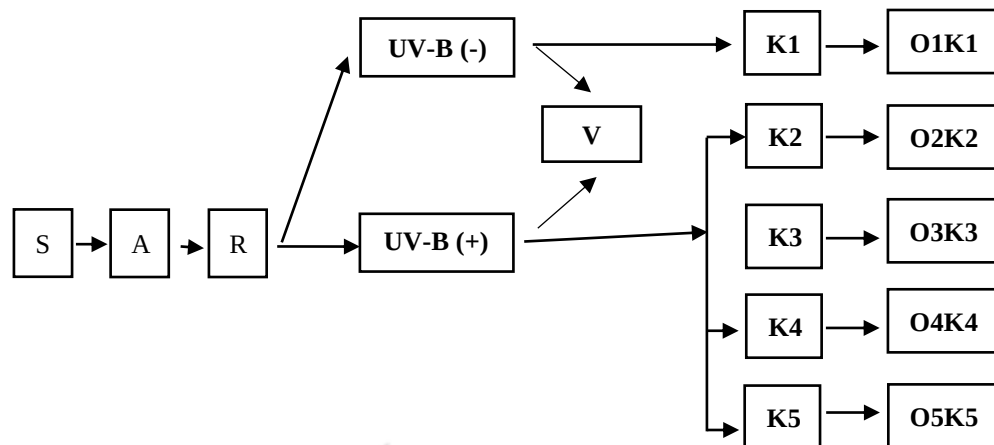


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group* dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah Tikus jantan Galur Wistar dengan bobot badan 200-250 g. Perlakuan terdiri dari kelompok K1 yaitu tikus sehat tanpa penyinaran UV-B), kelompok K2 yaitu kelompok kontrol negatif dimana tikus dipapar UV-B dengan pemberian vehicle NaCl secara injeksi subkutan pada bagian dorsal tikus, kelompok K3 yaitu kelompok perlakuan 1 dimana Tikus dipapar UV-B dengan pemberian hyaluronic acid (HA) dosis 200 μ L secara injeksi subkutan pada bagian dorsal tikus, kelompok K4 yaitu kelompok perlakuan 2 dimana tikus dipapar UV-B dengan perlakuan EH-MSCs secara injeksi subkutan dengan dosis 200 μ L pada bagian dorsal tikus, dan kelompok K5 yaitu kelompok perlakuan 3 dimana tikus dipapar UV-B dengan perlakuan kombinasi HA 200 μ L dan EH-MSCs 200 μ L secara injeksi subkutan.



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : *Sampling*

R : *Randomized*

UVB (+): Pemberian paparan UV-B

UVB (-) : Tanpa paparan UV-B

A : Aklimatisasi

V : Validasi pembentukan anomal model *collagen loss*

K1 : Tikus sehat tanpa paparan UV-B

K2 : Kontrol negatif (Tikus dengan paparan UV-B + injeksi NaCl 0,9% 200 μ L secara subkutan)

K3 : Kontrol positif (Tikus dengan paparan UV-B + injeksi *Hyaluronic Acid* (HA negatif (Tikus dengan paparan UV-B + injeksi) dosis 200uL secara subkutan)

K4 : Perlakuan 1 (Tikus dengan paparan UV-B + injeksi *EH-MSCs* dosis 200uL

K5 : Perlakuan 2 (Tikus dengan paparan UV-B + injeksi *EH-MSCs* dosis 200 μ L dan *Hyaluronic Acid* (HA) dosis 200 μ L secara subkutan)

O1K1 : Observasi ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 kelompok 1

O2K2 : Observasi ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 kelompok 2

O3K3 : Observasi ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 kelompok 3

O4K4 : Observasi ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 kelompok 4

O5K5 : Observasi ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 kelompok 5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

EH-MSCs (*Exosome Hipoksia Mesenchymal Stem Cells*)
dosis 200 μ L dan HA (Hyaluronic acid) 2,4 % b/v dosis
200 μ L

4.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen MMP-9 dan ekspresi gen COX2.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. *Exosome Hipoksia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs)

Exosome diperoleh dari *Animal Model Research Center, Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Semarang. *Exosome Mesenchymal Stem Cells* (E-MSCs) *hypoxia* adalah sediaan cair yang mengandung vesikel ekstraseluler berukuran nano (30–150 nm) yang dilepaskan oleh MSCs yang dikultur dalam kondisi hipoksia terkontrol (1–5% O_2). Proses isolasi *exosome* ini dilakukan menggunakan metode *tangential flow filtration*. *Exosome* yang dihasilkan kemudian disuspensikan dalam larutan buffer fosfat disimpan pada suhu 2–8°C digunakan untuk perlakuan pada hewan coba. EH-MSCs diinjeksikan secara subkutan di daerah dorsal yang terpapar sinar UVB

sebanyak 200 μ L untuk masing-masing kelompok perlakuan diinjeksikan pada hari ke 22.

Satuan : *mikroliter* (μ L)

Skala: Rasio

4.2.2.2. *Hyaluronic acid* (HA)

HA diperoleh dari PT. HAJU dengan merk Staris. HA yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari sediaan dalam kemasan vial steril berisi larutan natrium hialuronat 1% disimpan pada suhu 2–8°C. Sediaan gel HA dengan dosis 2,4% b/v yang akan di injeksikan pada kulit mencit sebanyak 200 μ L secara subkutan di daerah dorsal yang terpapar sinar UVB untuk masing-masing kelompok perlakuan diinjeksikan pada hari ke 22.

Satuan: *mikroliter* (μ L)

Skala: Rasio

4.2.2.3. Ekspresi gen MMP-9

MMP-9 adalah enzim yang berguna untuk mendegradasi kolagen pada kulit. Sampel jaringan kulit di isolasi pada hari ke-27 perlakuan dan di analisis ekspresi gen MMP-9. Banyaknya MMP-9 dalam jaringan kulit tikus yang dinyatakan dalam satuan rasio, diukur menggunakan metode qRT-PCR dengan yang dibandingkan dengan housekeeping gen GAPDH.

Satuan : Relative Expression

Skala: Rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen COX-2

COX-2 adalah sitokin pro-inflamasi yang memiliki peran dalam proses menginduksi degradasi kolagen akibat paparan UVB. Sampel jaringan kulit di isolasi pada hari ke-21 perlakuan dan di analisis ekspresi gen COX-2. Banyaknya COX-2 dalam jaringan kulit tikus yang dinyatakan dalam satuan rasio, diukur menggunakan metode qRT-PCR dengan yang dibandingkan dengan housekeeping gen GAPDH.

Satuan : Relative expression

Skala : Rasio

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 g yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang diperoleh dari SCCR Indonesia yang dipapar UVB 302 nm dengan MED 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit dengan jarak 20 cm selama 5 kali seminggu selama 2 minggu hingga berkurangnya densitas kolagen.(Lampiran 5)

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tikus putih jantan Galur Wistar.
2. Umur 2-3 bulan.
3. Kondisi sehat.
4. Berat badan 200-250 g.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan Galur Wistar dengan kriteria :

1. Mengalami infeksi selama penelitian
2. Tergigit oleh tikus lain selama penelitian
3. Mengalami luka bakar selama penelitian

4.3.2.3. Kriteria Drop Out

Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Simple Randomized Sampling*. Tikus putih jantan Galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok Sham (tikus sehat tanpa paparan UV-B), Kontrol Negatif (tikus dipapar UV-B dengan pemberian NaCl 0.9% secara subkutan), Kontrol positif (tikus dipapar UV-B dengan pemberian HA dosis 200 μ L secara subkutan) Perlakuan 1 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan exosome hipoksia MSCs dosis 200 μ L sel secara subkutan) dan Perlakuan 2

(tikus dipapar UV-B dengan perlakuan kombinasi exosome hipoksia MSCs 200 μ L dan HA 200 μ L sel 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.¹¹⁹

Rumus Federer : $(t-1)(n-1) \geq 15$

Sampel tiap Kelompok : $(5-1)(n-1) \geq 15$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 5 ekor tikus perkelompok dan di tambahkan 1 hewan uji perkelompok sebagai cadangan. Jadi jumlah seluruh sampel adalah 30 ekor tikus.

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 160 mJ/cm²,

pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah *vacutainer*, tabung hematokrit, 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 yang terdiri seperti *gel base*, ketamin,, *xylazine*, etanol, akuades, kloroform, primer MMP-9, primer COX-2

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan nomor 692/XII/2025/ komisi Bioetik (Lampiran 1)

4.5.2. Penyinaran UV-B dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan isoflurane 3-5%. Rambut pada bagian punggung tikus di potong hingga bersih.. Punggung tikus dipapar dengan UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose*

(MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari dengan jarak 20cm selama 5 kali seminggu (hari 1, 2, 4, 5, dan 7) selama 2 minggu ¹¹⁵. Pada tikus K2 kemudian diberi perlakuan secara subkutan injeksi NaCl, tikus K3 diberikan injeksi subkutan HA. Tikus K4 diberi perlakuan secara subkutan menggunakan EH-MSCs. Tikus pada K5 diberi perlakuan secara subkutan menggunakan kombinasi EH-MSCs dan HA yang 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-2 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 Menggunakan Pengecatan Kolagen

Pengecatan kolagen dilakukan dengan menggunakan metode pengecatan *Masson Trichome* dengan tahapan sebagai berikut :

1. Slide jaringan dideparafinisasi.
2. Cairan Bouin dipanaskan pada suhu 54-64°C.

3. Slide diinkubasi dalam Cairan Bouin yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
4. Slide diinkubasi dalam Hematoxylin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian bilas dengan air.
5. Slide diinkubasi dalam larutan *Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin* selama 15 menit, kemudian dibilas dengan air.
6. Slide diinkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat selama 10-15 menit.
7. Slide diinkubasi dalam larutan *Aniline Blue* selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air.
8. Slide diinkubasi dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit.
9. Slide dilakukan proses dehidrasi, kemudian pasang *desk glass*.

4.5.5. Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen MMP-9 dan COX-2 dengan qRT-PCR

Analisis ekspresi gen dilakukan dengan metode *quantitative real-time* PCR (qRT-PCR). Jaringan kulit yang telah disimpan dalam RNA later dihomogenisasi menggunakan homogenizer jaringan dan diekstraksi RNA totalnya menggunakan RNeasy Mini Kit (Qiagen) sesuai protokol pabrikan. Kemurnian dan konsentrasi RNA diukur menggunakan spektrofotometer NanoDrop pada panjang gelombang 260/280 nm. RNA total kemudian dikonversi menjadi cDNA menggunakan RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo

Fisher Scientific). Amplifikasi qRT-PCR dilakukan menggunakan SYBR Green PCR Master Mix dalam sistem PCR real-time (Applied Biosystems StepOnePlus™) dengan primer spesifik untuk gen MMP-9 dan COX-2, serta gen housekeeping GAPDH sebagai kontrol internal. Kondisi siklus PCR terdiri dari pre-denaturasi pada 95°C selama 10 menit, diikuti oleh 40 siklus denaturasi 95°C selama 15 detik, annealing 60°C selama 30 detik, dan ekstensi 72°C selama 30 detik. Data dianalisis menggunakan metode $\Delta\Delta C_t$, dan hasil diekspresikan dalam bentuk fold change terhadap kelompok kontrol sehat.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research*, Semarang, Jawa Tengah pada November – Desember 2025. (Lampiran3)

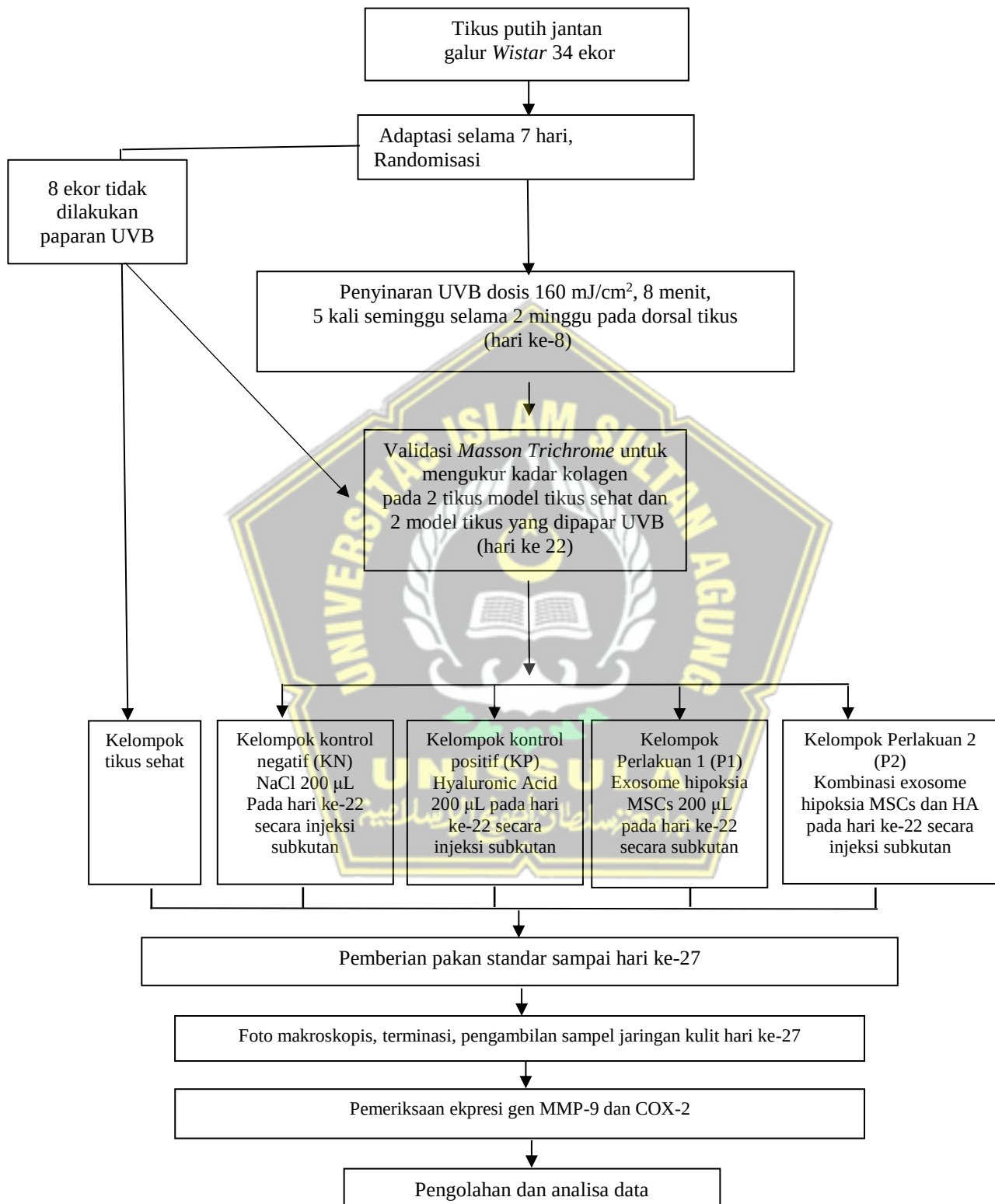
4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis secara statistik menggunakan perangkat lunak SPSS versi 26.0 for Windows. Seluruh data yang diperoleh dari masing-masing variabel, yaitu ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 dicatat dalam bentuk numerik dengan skala rasio. Analisis diawali dengan uji deskriptif untuk mengetahui nilai rerata, standar deviasi, nilai minimum, dan maksimum dari setiap kelompok perlakuan. Sebelum dilakukan uji komparatif, data terlebih dahulu diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas varians menggunakan

Levene's Test. Data Ekspresi gen MMP-9 terdistribusi normal ($p>0,05$) dan homogen ($p>0,05$) dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok. Hasil ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan ($p<0,05$), lalu dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD (*Least Significant Difference*). Pada Ekspresi COX-2 data berdistribusi normal ($p>0,05$) tetapi tidak homogen ($p<0,05$), sehingga tetap dilakukan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* *Tamhane*. Nilai $p<0,05$ menunjukkan berbeda signifikan secara statistik dalam seluruh pengujian. (Lampiran 2)



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

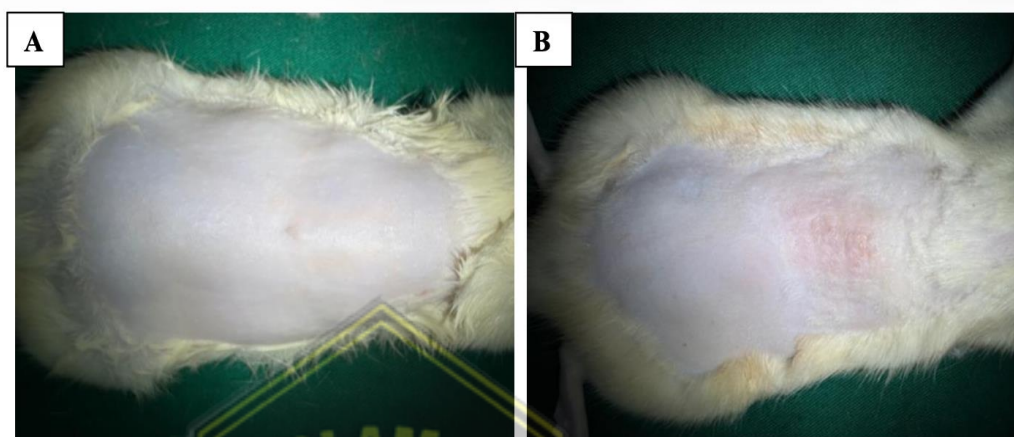
5.1. Hasil Penelitian

Penelitian merupakan studi eksperimental yang dilaksanakan pada bulan November hingga Desember 2025 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Semarang, Indonesia. *In vivo* tentang kombinasi *EH*-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 menggunakan tikus jantan galur wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB 302 nm dengan MED 160 mJ/cm² yang dipapar selama 8 menit dengan jarak 20 cm sebanyak 5 kali seminggu selama 2 minggu. Keseluruhan 30 ekor tikus yang digunakan berhasil melalui seluruh rangkaian penelitian mulai dari tahap adaptasi sampai terminasi, tidak ada tikus yang mati.

5.1.1. Hasil Validasi Collagen Loss pada tikus yang dipapar UVB

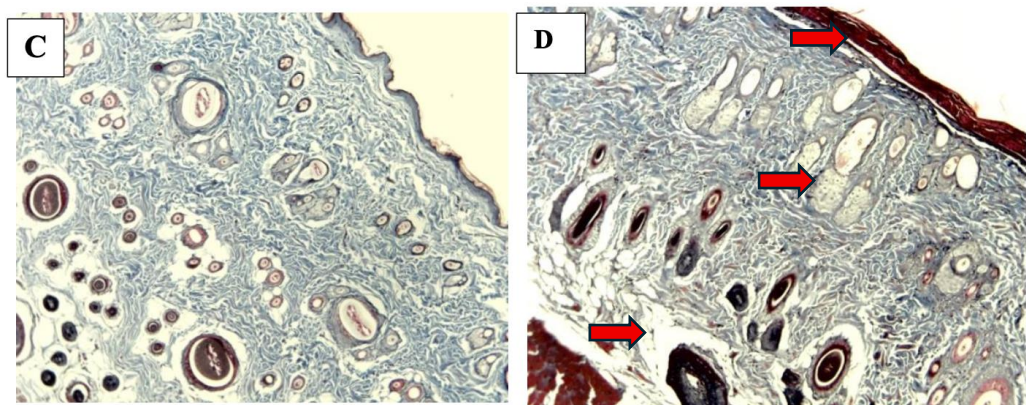
Model tikus *Collagen Loss* dikembangkan dengan penyinaran UVB 302 nm dari jarak 20 cm dengan intensitas 1 kali MED (160mJ/cm) durasi paparan selama 8 menit dilakukan sebanyak 10 kali dalam kurun waktu 14 hari. Hasil pengamatan makroskopis secara visual (Gambar 5.1.A) bahwa pada tikus sehat yang tidak 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 tikus yang dipapar menunjukkan permukaan kulit tampak kurang homogen, terdapat penebalan jaringan kulit, terlihat

perubahan warna local berupa area kemerahan (eritema) (Gambar 5.1. B).



Gambar 5.1. Gambaran makroskopis pengamatan secara visual menggunakan kamera handphone pada tikus (A) sehat (tidak terpapar UVB) dan (B) dipapar UVB.

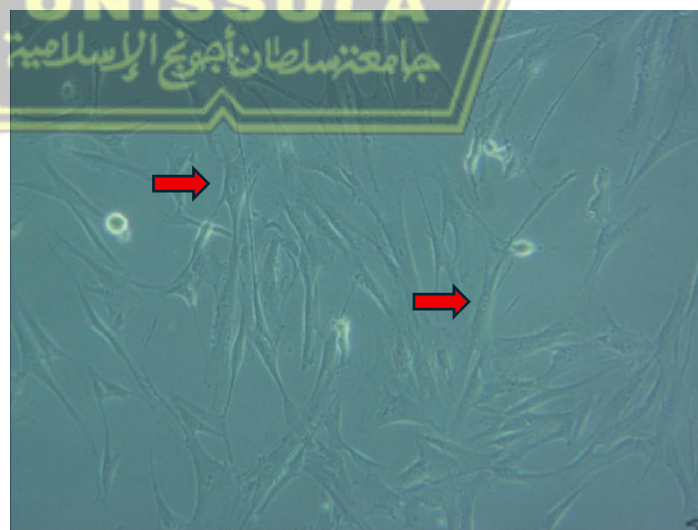
Hasil validasi model collagen loss akibat paparan UVB secara mikroskopis menggunakan pewarnaan *Masson Trichrome*. Pada tikus sehat epidermis tampak dengan ketebalan normal. Serabut kolagen warna biru intens yang padat, tebal dan terorganisasi dengan baik di lapisan dermis. Distribusi collagen merata, tanpa fragmentasi, struktur adneksa kulit tampak normal. (Gambar 5.2.C). Pada tikus yang dipapar UVB menunjukkan terjadinya penurunan kepadatan dan keteraturan serabut kolagen, ditandai dengan distribusi kolagen biru yang lebih jarang dan tidak teratur. Epidermis tampak menebal (akantosis). *Collagen Loss* juga ditandai dengan pelebaran ruang stroma dermis dan disorganisasi matriks ekstraseluler di sekitar struktur adneksa. (Gambar 5.2.D)



Gambar 5.2. Gambaran mikroskopis pengamatan menggunakan mikroskop Cahaya pada tikus (C) sehat (tidak terpapar UVB) dan (D) dipapar UVB

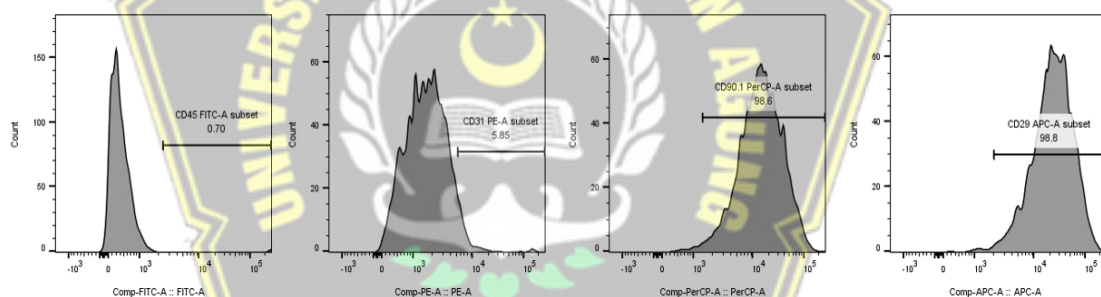
5.1.2. Hasil Validasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs)

Proses isolasi *mesenchymal stem cell* (MSCs), Setelah isolasi, sel-sel tersebut dikultur dalam flask dengan media kultur. Pada pengamatan mikroskopis terlihat bahwa sel-sel tersebut melekat pada dasar flask dan menunjukkan morfologi berbentuk *spindle-like*. (Gambar 5.3)



Gambar 5.3. Hasil pengamatan bentuk *spindel-like* EH-MSCs dengan pembesaran 100x

Sel-sel MSCs divalidasi melalui analisis flow cytometry untuk menunjukkan kemampuan dalam mengekspresikan berbagai marker permukaan tertentu. Hasil analisis flow cytometry, populasi sel menunjukkan ekspresi marker positif mesenchymal stem cell (MSC) yang tinggi, yaitu CD90 sebesar 98,6% dan CD29 sebesar 98,8%. Sebaliknya, marker negatif MSC menunjukkan ekspresi yang sangat rendah, dengan CD45 sebesar 0,70% dan CD31 sebesar 5,85% dapat dilihat (Gambar 5.4). Temuan ini mengonfirmasi bahwa populasi sel yang digunakan memiliki karakteristik yang sesuai dengan mesenchymal stem cell (MSC).

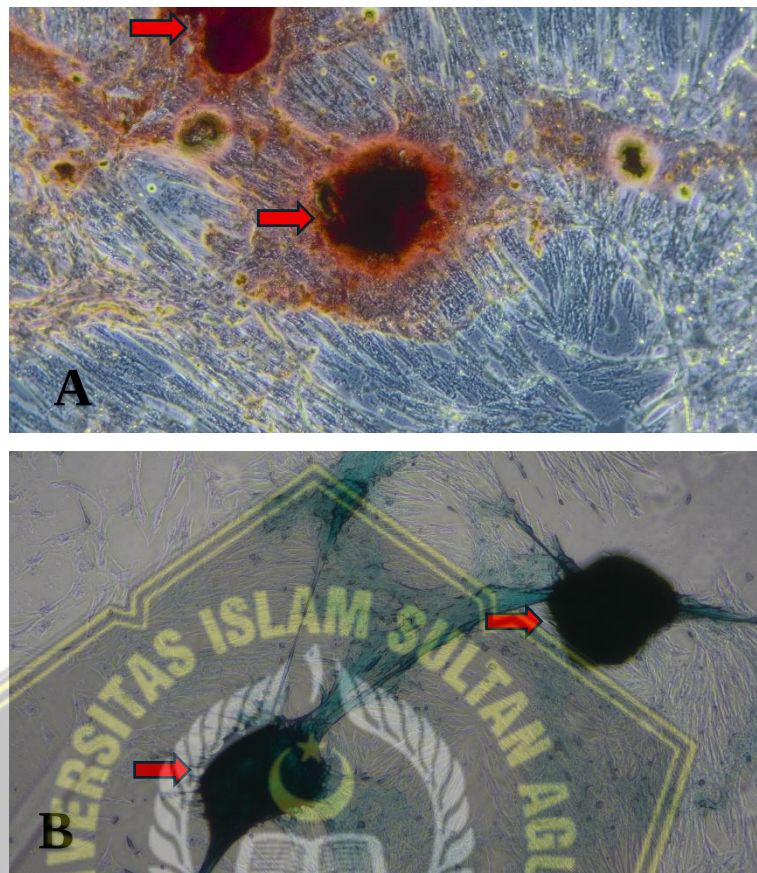


Gambar 5.4. Ekspresi CD90, CD29, CD45, CD31 pada MSCs

Penelitian ini memvalidasi kemampuan MSCs untuk berdeferensiasi menjadi osteosit dan kondrosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MSCs dapat berdiferensiasi menjadi osteosit dan kondrosit. Pada proses diferensiasi osteogenik, MSCs diinduksi menggunakan medium osteogenik khusus selama 21 hari. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Alizarin Red yang menunjukkan deposisi endapan kalsium berwarna merah bata secara intens (Gambar 5.4.A). Hasil ini menegaskan terjadinya diferensiasi MSCs

menuju lini osteoblas yang disertai dengan proses mineralisasi matriks ekstraseluler. Hasil uji diferensiasi dengan pewarnaan *Chondrocyte Alician Blue* memperlihatkan terbentuknya agregat seluler dengan matriks ekstraseluler berwarna biru positif (Gambar 5.4.B). Pewarnaan ini mengindikasikan adanya akumulasi glikosaminoglikan (GAGs) dan proteoglikan asam, yang merupakan komponen utama matriks kartilago, sehingga menunjukkan kemampuan kondrogenik MSCs. Dengan demikian, karakteristik morfologi serta potensi diferensiasi osteogenik dan kondrogenik yang ditunjukkan mengonfirmasi identitas MSCs, sehingga sel tersebut dinyatakan layak untuk digunakan pada tahapan pengujian selanjutnya.



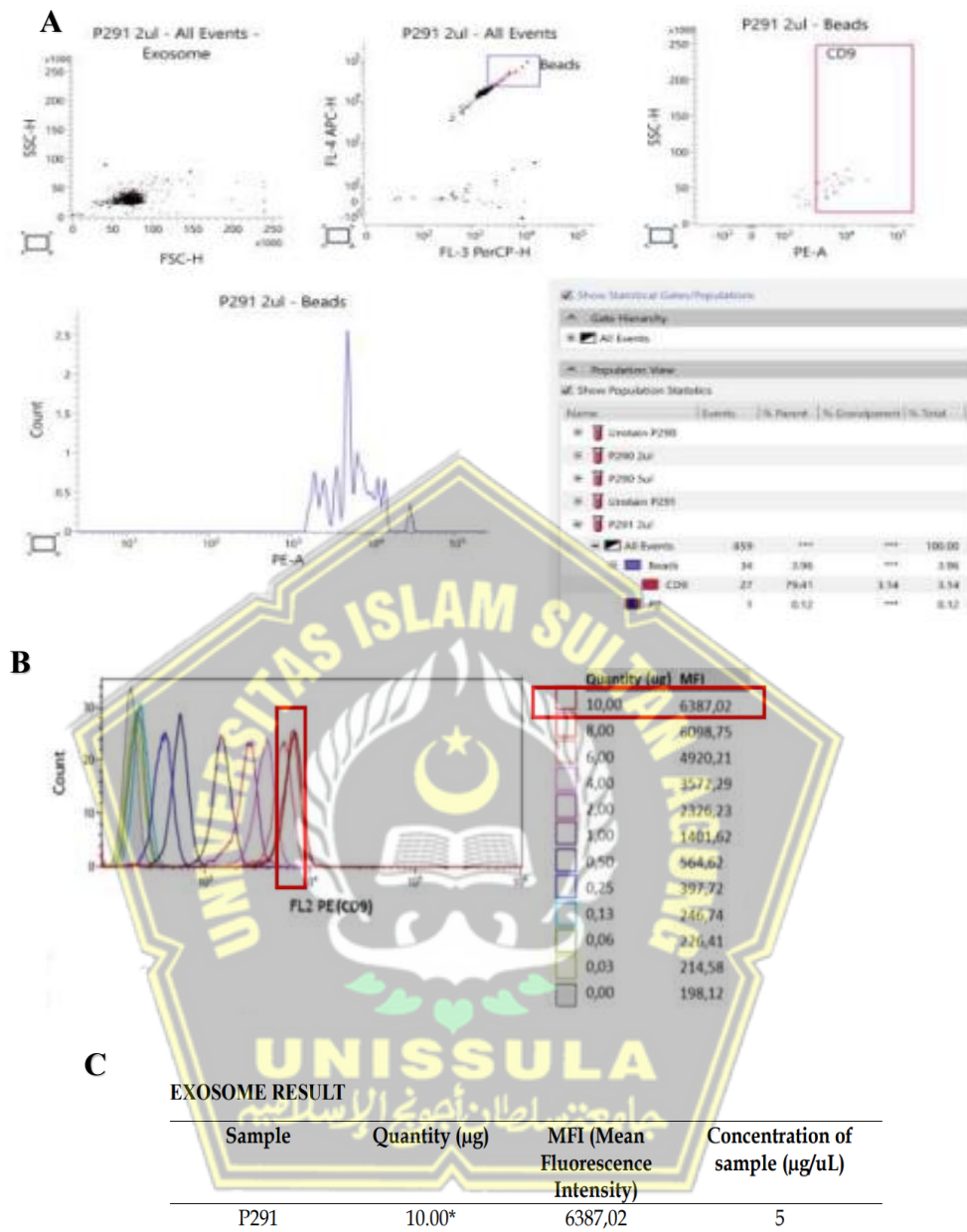


Gambar 5.5. Hasil Diferensiasi MSCs menjadi osteosit (pewarnaan Alizarin-red, perbesaran 200x) (A); dan MSCs berdiferensiasi menjadi kondrosit (pewarnaan Alician Blue perbesaran 100x) (B).

Selanjutnya dilakukan proses hipoksia pada sel MSCs dengan melibatkan pengkondisian sel dalam lingkungan dengan kadar oksigen rendah antar 0-5% selama 24 jam yang bertujuan untuk meningkatkan karakteristik dan kemampuan sel MSCs . Media kultur MSCs yang mengandung *secretome* kemudain difiltrasi menggunakan metode TFF (*Tangensial Flow filtration*) berdasarkan *molecular weigh cut off* didapatkan molekul berukuran 100.500 kDa yang mengandung *Exosome*. Selanjutnya EH-MSCs divalidasi menggunakan *flowcytometry* untuk memastikan bahwa sel yang

terfiltrasi mengandung marker exosome caranya dengan melihat kuantifikasi marker exosome yang terbaca yaitu CD63, CD81, dan CD9. Hasilnya jumlah exosome yang terbaca dalam analisis flowcytometry menggunakan marker CD81, CD63 dan CD9 positif 91%. (Gambar 5.6)

Hasil analisis *flow cytometry* menunjukkan bahwa sampel P291 mengandung *exosome* yang terdeteksi melalui pendekatan *bead-based* dan mengekspresikan marker *exosome* CD9. Temuan ini menegaskan keberhasilan isolasi dan karakterisasi *exosome*, sehingga sampel dinyatakan mengonfirmasi keberhasilan karakterisasi *exosome*. Analisis *dynamic range* menunjukkan peningkatan MFI CD9 seiring kenaikan konsentrasi antibodi hingga mencapai kondisi saturasi pada konsentrasi 10 µg/ml, yang ditandai dengan puncak fluoresensi pada area maksimum. Analisis flow cytometry pada sampel eksosom P291 menunjukkan bahwa penggunaan 10 µg sampel (5 µg/µL) menghasilkan nilai MFI sebesar 6.387,02, yang menandakan intensitas fluoresensi tinggi dan kondisi pengukuran yang optimal. Penelitian menunjukkan bahwa MSCs yang dikultur dalam kondisi hipoksia memiliki viabilitas yang lebih tinggi dan dapat menghasilkan sitokin dan factor pertumbuhan , termasuk IL-10 dan TGF B, yang mendukung proses regenerasi jaringan dan penyembuhan luka.



Gambar 5.6. Validasi dan Kuantifikasi Exosome MSCs Menggunakan Flow Cytometry. (A) Analisis scatter plot (B) Kurva standar (*Dynamic Range*) (C)Tabel hasil kuantifikasi *exosome*.

5.1.3. Efek kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap Ekspresi Gen MMP-9

Penelitian kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen MMP-9 pada tikus galur Wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB dianalisa pada hari ke-20 atau 5 hari setelah pemberian perlakuan. Tabel 5.1 menunjukkan hasil analisa ekspresi gen *Matrix Metalloproteinase-9* (MMP-9). Rerata ekspresi gen MMP-9 pada kelompok K2 lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya, yaitu sebesar 3.148 ± 0.199 . Kemudian diikuti oleh kelompok K3 (UVB+HA) memiliki ekspresi gen MMP-9 sebesar 2.445 ± 0.079 , dan selanjutnya kelompok K4 (UVB+EH-MSCs) sebesar 1.911 ± 0.233 . Rerata ekspresi gen MMP-9 kelompok K5 (UVB+kombinasi EH-MSCs dan HA) dengan nilai 1.243 ± 0.174 . Rerata ekspresi gen MMP-9 pada kelompok K1 tanpa paparan UVB yaitu sebesar 1.000 ± 0.000 . Hasil *Shapiro-Wilk* menunjukkan seluruh data berdistribusi normal ($p > 0,05$), dan uji *Levene test* menunjukkan varian data yang homogen ($p > 0,05$). Distribusi data normal dan varian data homogen sehingga dilakukan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan dengan nilai p -value 0,000 ($p < 0,05$) minimal pada satu pasang kelompok perlakuan. Kemudian

dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk menentukan kelompok mana yang berbeda signifikan.

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Ekspresi Gen MMP-9

Kelompok Perlakuan	Ekspresi gen MMP-9 (Rerata $\pm$ SD)	Nilai signifikansi (<i>p</i>) pada hasil uji		
		Normalitas distribusi data dengan Shapiro Wilk	Homogenitas varian data dengan Levene test	Beda dengan One Way ANOVA
K1 (sehat)	1,000 $\pm$ 0,000			
K2 (UVB+NaCl)	3.148 $\pm$ 0.199	0,516		
K3 (UVB+HA)	2.445 $\pm$ 0.079	0,336	0.055	0.000*
K4 (UVB +EH-MSCs)	1.911 $\pm$ 0,233	0,569		
K5(UVB+HA+EH-MSCs)	1.243 $\pm$ 0,174	0.058		

Keterangan: * Menunjukkan berbeda secara signifikan $p < 0.05$

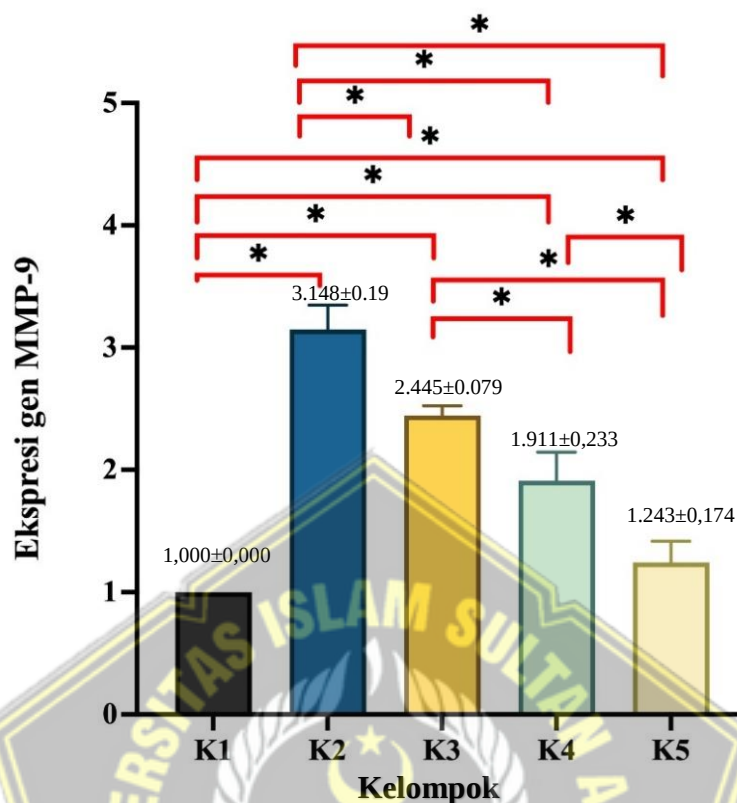
Hasil uji *Post Hoc LSD* yang disajikan pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.6 menunjukkan bahwa ekspresi gen MMP-9 pada kelompok tikus Sehat (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok K2 (UVB+NaCl), dengan nilai $p=0.000$. K1 lebih rendah dibandingkan dengan K2. Kelompok K2 berbeda signifikan dengan kelompok K3 dengan nilai $p=0.000$, K2 lebih tinggi dibanding K3. Kelompok K2 berbeda signifikan dan lebih tinggi dibandingkan dengan K4. Kelompok K3 berbeda signifikan dengan kelompok K4 dengan nilai $p=0.000$, K3 lebih tinggi dari K4. Kelompok K5 berbeda signifikan dan lebih rendah dibanding K4 dengan nilai $p=0.000$. Kelompok K5 berbeda signifikan dan lebih rendah dibanding K3 dengan nilai $p=0.000$. Kelompok K5 berbeda

signifikan dan lebih rendah dibanding K2 dengan nilai $p=0,000$. .
 Kelompok K5 berbeda signifikan dan lebih tinggi dibanding K1 dengan nilai $p=0,015$. Pada kelompok K2 ekspresi gen MMP-9 meningkat secara signifikan mencapai rata-rata yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok K1, K3, K4 dan K5. Kelompok K3 dan K4 menunjukkan tren penurunan ekspresi gen MMP-9, namun penurunan yang paling besar terlihat pada K5 tetapi belum bisa menyamai dengan kondisi sehat (K1).

Tabel 5.2. Perbedaan Ekspresi Gen MMP-9 antara kelompok penelitian

	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0.000*	0.000*	0.000*	0.015*
K2	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*
K3	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*
K4	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
K5	0.015*	0.000*	0.000*	0.000*	

*Uji *Post Hoc* LSD dengan nilai signifikan $p<0.05$



Gambar 5.6. Ekspresi Gen MMP-9 pada berbagai kelompok perlakuan.*Berbeda signifikan ($p < 0.05$) berdasarkan uji *Post Hoc* LSD.

5.1.4. Efek kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap Ekspresi gen COX-2

Hasil analisis qRT-PCR (Tabel 5.3) menunjukkan hasil rerata ekspresi gen COX-2. Pada kelompok K1 lebih rendah dari semua kelompok perlakuan yaitu sebesar $1.000 \pm 0,000$. Kemudian kelompok perlakuan K5 (UVB+ HA+EH-MSCs) sebesar 1.103 ± 0.045 . Ekspresi gen COX-2 pada kelompok K4 (UVB +EH-MSCs) yaitu sebesar $1.468 \pm 0,069$. Selanjutnya pada kelompok K3 (UVB+HA) yaitu $1.901 \pm 0,049$. Rerata Ekspresi gen COX-2 pada K2 (UVB +NACL) yaitu sebesar $2.366 \pm 0,053$. Seluruh kelompok

ekspresi gen COX-2 berdasarkan uji *Shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene Test* diperoleh hasil data tidak homogen dengan nilai $p = 0,012$. Karena data berdistribusi normal namun tidak homogen maka analisis data menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil *uji one way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian dengan nilai p -value 0,000 ($p < 0,05$). Hasil signifikan pada uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

Tabel 5.3. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas Pada Ekspresi Gen COX-2

Kelompok Perlakuan	Ekspresi gen COX-2 (Rerata $\pm$ SD)	Nilai signifikansi (p) pada hasil uji		
		Normalitas distribusi data dengan <i>Shapiro Wilk</i>	Homogenitas varian data dengan <i>Levene test</i>	Beda dengan <i>One Way ANOVA</i>
K1 (sehat)	1,000 $\pm$ 0,000			
K2 (UVB+NaCl)	2.366 $\pm$ 0.053	0,522		
K3 (UVB+HA)	1.901 $\pm$ 0.049	0,351	0.012	0,000*
K4 (UVB +EH-MSCs)	1.468 $\pm$ 0,069	0,175		
K5(UVB+HA+EH-MSCs)	1.103 $\pm$ 0,045	0.923		

Keterangan: * Menunjukkan berbeda secara signifikan $p < 0.05$

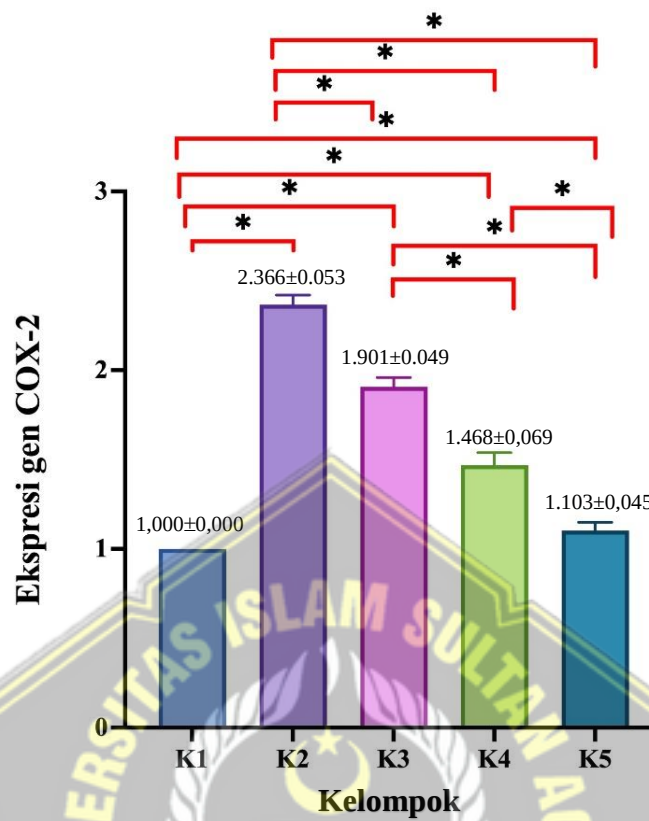
Hasil uji *Post Hoc Tamhane* Table 5.4 dan Gambar 5.7 menunjukkan ekspresi gen COX-2 pada kelompok tikus sehat K1 terdapat perbedaan signifikan terhadap semua kelompok dengan nilai $p < 0,05$. K1 lebih rendah dibanding kelompok tikus K2, K3, K4 dan

K5. Pada kelompok K2 ekspresi gen COX-2 berbeda secara signifikan dan lebih tinggi dibandingkan dengan K1, K3, K4, dan K5. Kelompok K3 berbeda signifikan dengan nilai $p < 0,05$ dan lebih tinggi dibanding dengan kelompok K4 dan K5. Pada kelompok perlakuan K4 juga berbeda signifikan dan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok K5. Kelompok K5 secara statistik berbeda signifikan dibandingkan kelompok terapi tunggal pada K3 dan K4. Ekspresi gen COX-2 pada K5 berbeda signifikan dengan nilai $p = 0.024$ dan lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok K1.

Tabel 5.4. Perbedaan ekspresi gen COX-2 antara kelompok penelitian

	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0.000*	0.000*	0.000*	0.024*
K2	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*
K3	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*
K4	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
K5	0.024*	0.000*	0.000*	0.000*	

*Uji Post Hoc *Tamhane* dengan nilai signifikan $p < 0.05$



Gambar 5.7. Ekspresi gen COX-2 pada berbagai kelompok perlakuan. Menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik ($p < 0.05$) antar kelompok.

5.2. Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan radiasi UVB 302 nm dari jarak 20 cm dengan intensitas 1 kali MED (160mJ/cm) durasi paparan selama 8 menit menyebabkan *collagen loss* pada kulit punggung tikus. Hasil pengamatan mikroskopis tampak penurunan kepadatan dan ketebalan serabut kolagen pada dermis serta perubahan struktur jaringan ikat, yang merupakan karakteristik dari *collagen loss* akibat paparan UVB. Efek UVB terhadap *collagen loss* pada kulit didukung dengan hasil pewarnaan *Masson Trichome* yang menunjukkan jaringan dengan intensitas warna

biru berkurang, distribusi serabut kolagen yang tidak merata, serta pelebaran ruang antar serabut kolagen sebagaimana karakteristik kulit yang mengalami *collagen loss*. Hasil ini sesuai dengan penelitian Dai Q et al, 2025 yang melaporkan bahwa UVB memicu akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan sehingga mengaktifasi jalur sinyal proinflamasi seperti *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dan *Activator protein-1*(AP-1). Aktivasi jalur sinyal proinflamasi berperan penting dalam meningkatkan ekspresi mediator inflamasi, termasuk COX-2, serta MMP-9 yang berkontribusi terhadap degradasi matriks ekstraseluler dermis.³¹⁻³² Selain itu, Gao S et al, (2021) melaporkan bahwa paparan UVB menyebabkan peningkatan ekspresi MMP-9 dan juga COX-2 yang menyebabkan terjadinya degradasi kolagen pada matriks ekstraseluler dermis.

Hasil pengukuran ekspresi gen MMP-9 yang lebih tinggi dibandingkan tikus sehat mendukung efek paparan UVB terhadap *collagen loss* yang diamati pada kelompok K2. Hasil ini sesuai dengan Jeayeng S et al, (2017) bahwa terbentuknya ROS akibat paparan UVB mengaktifasi jalur transduksi sinyal utama seperti MAPK, NF- κ B, dan JAK2/STAT3 yang secara kolektif berperan dalam meningkatkan ekspresi *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9), enzim utama yang bertanggung jawab atas terjadinya *collagen loss*. Tingginya ekspresi COX-2 pada kelompok K2 mencerminkan kondisi inflamasi akut yang tidak terkontrol akibat tidak adanya intervensi terapeutik. Aktivasi COX-2 akan meningkatkan sintesis

prostaglandin E2 (PGE2), yang berkontribusi terhadap vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, dan infiltrasi sel inflamasi, sehingga memperberat kerusakan jaringan kulit akibat UVB.⁵⁸ Stimuli ekspresi gen MMP-9 akibat paparan UVB menunjukkan terjadinya aktivasi degradasi matriks ekstraseluler yang lebih intensif, khususnya terhadap kolagen dermal. Peningkatan MMP-9 mencerminkan respons inflamasi dan stres oksidatif yang tinggi, yang memicu aktivasi jalur sinyal inflamasi seperti NF- κ B dan MAPK.³⁵⁻³⁶

Pemberian injeksi *Hyaluronic acid* (HA) pada kulit tikus yang mengalami *collagen loss* akibat paparan UVB menunjukkan rerata ekspresi MMP-9 dan COX-2 yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K2 (UVB+NaCl). Efek HA ini menunjukkan bahwa HA memiliki aktifitas antioksidan dan antiinflamasi sebagaimana dilaporkan oleh Edwards PC, et al (2007). HA berinteraksi dengan reseptor permukaan sel, terutama *Cluster of Differentiation 44* (CD44), yang diekspresikan oleh keratinosit, fibroblas, dan sel imun pada jaringan kulit. Interaksi HA dengan reseptor CD44 memicu aktivasi jalur sinyal intraseluler yang berperan dalam regulasi inflamasi dan remodeling matriks ekstraseluler. Dalam kondisi inflamasi atau stres oksidatif, aktivasi CD44 berperan dalam modulasi jalur Janus kinase/*signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT), khususnya STAT3. Ikatan HA dengan CD44 dapat menghambat fosforilasi STAT3 melalui beberapa mekanisme, diantaranya (1) kompleks HA-CD44 menekan aktivasi kinase hulu seperti JAK, sehingga fosforilasi STAT3 pada

residu tirosin (Tyr705) berkurang dan (2) aktivasi CD44 oleh HA dapat meningkatkan ekspresi regulator negatif jalur STAT3, seperti Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS), yang berfungsi sebagai umpan balik negatif terhadap aktivasi JAK/STAT. Penurunan fosforilasi STAT3 menghambat translokasi STAT3 ke inti sel, sehingga menurunkan transkripsi gen-gen target yang berperan dalam inflamasi dan degradasi matriks ekstraseluler, termasuk COX-2 dan MMP-9. Dengan demikian, HA melalui interaksinya dengan CD44 berkontribusi dalam menekan respons inflamasi dan proses degradasi kolagen. Penurunan COX-2 berkontribusi pada berkurangnya produksi prostaglandin proinflamasi yang berperan dalam mempertahankan inflamasi kronis pada jaringan kulit. Selain itu, aktivasi CD44 oleh HA juga berperan dalam modulasi aktivitas MMP-9 dengan menghambat aktivasi faktor transkripsi yang terlibat dalam degradasi matriks ekstraseluler.⁹⁹ Penurunan ekspresi MMP-9 menyebabkan berkurangnya degradasi kolagen tipe I dan III, sehingga membantu mempertahankan integritas struktur kulit. Melalui mekanisme tersebut, HA tidak hanya berfungsi sebagai pengisi ruang atau agen hidrasi, tetapi juga berperan aktif dalam menciptakan lingkungan mikro antiinflamasi yang mendukung homeostasis matriks ekstraseluler. Penurunan ekspresi COX-2 dan MMP-9 akibat aktivasi reseptor CD44 berkontribusi terhadap penghambatan kehilangan kolagen, meskipun jaringan kulit mengalami kerusakan akibat paparan UVB.¹⁰⁰

Terapi tunggal EH-MSCs pada tikus collagen loss akibat paparan UVB menunjukkan perbaikan yang ditandai dengan rerata ekspresi MMP-9

dan COX-2 yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K2 (UVB+NaCl) dan K3 (UVB+HA). EH-MSc yang digunakan pada penelitian ini merupakan *exosome* yang dihasilkan dari mesemkimal stem sel yang telah berdiferensiasi sehingga menunjukkan efek antiinflamasi yang baik. Hasil ini sesuai dengan penelitian Jessica Angelina et al (2025) bahwa EH-MSCs dapat menurunkan ekspresi MDA dan MMP-1 pada tikus model *collagen loss*. EH-MSCs dapat mempengaruhi ekspresi MMP-9 dan COX-2 terutama melalui mekanisme parakrin, dengan melepaskan mediator bioaktif seperti sitokin antiinflamasi, faktor pertumbuhan, dan microRNA yang menekan aktivasi jalur pensinyalan proinflamasi, termasuk NF- κ B dan MAPK yang berkontribusi pada penurunan transkripsi gen COX-2 sebagai mediator inflamasi serta MMP-9 sebagai enzim utama degradasi matriks ekstraseluler.

Pada penelitian ini *exosome* yang digunakan adalah berasal dari prekondisi hipoksia MSCs, penelitian sebelumnya melaporkan bahwa perkondisi hipoksia dapat meningkatkan potensi parakrin MSCs hingga 2-3 kali lipat dibandingkan kondisi normoksia melalui stabilisasi *Hypoxia-Inducible Factor-1alpha* (HIF-1 α). Exosome yang disekresikan MSCs dalam kondisi hipoksia memiliki *enrichment* signifikan terhadap miRNA spesifik seperti miR-21, miR-125b, dan miR-146a yang berperan dalam modulasi inflamasi dan promosi angiogenesis, serta peningkatan kandungan protein bioaktif seperti VEGF, bFGF, dan TGF- β yang esensial untuk

regenerasi jaringan.⁸²Pemberian terapi tunggal menunjukkan kemampuan dalam menurunkan respons inflamasi dan degradasi jaringan.

Pemberian injeksi subkutan kombinasi EH-MSCs dan HA berpengaruh signifikan terhadap ekspresi MMP-9 dan COX-2 yang lebih rendah dibandingkan dengan pemberian HA tunggal dan EH-MSc tunggal. Hasil ini sesuai dengan penelitian Yufang Luo et al (2022) yang menunjukkan bahwa HA mendukung angiogenesis yang diinduksi oleh kombinasi MSCs dan *endothelial colony forming cells* (ECFCs) melalui aktivasi jalur CD44/miR-139-5p. HA meningkatkan proliferasi dan migrasi sel serta ekspresi penanda vaskular, menunjukkan peningkatan efektivitas fungsional dari sel punca ketika digunakan bersama HA dibandingkan tanpa HA. Mengindikasikan bahwa kombinasi EH-MSCs dan HA mampu bekerja secara sinergis dalam menekan stres oksidatif, menghambat aktivasi enzim degradasi matriks, dan mendukung proses regenerasi jaringan kulit.⁸³

Kombinasi EH-MSCs dan HA bekerja melalui aktivitas yang sinergis yang berkaitan dengan kemampuan EH-MSCs dalam melepaskan berbagai faktor parakrin bioaktif, seperti growth factors, sitokin antiinflamasi (IL-10), dan microRNA regulator. Berbagai molekul bioaktif, termasuk miRNA-155-15p. miRNA ini berperan dalam regulasi pascatranskripsi gen-gen yang terlibat dalam proses inflamasi dan remodeling jaringan. miRNA-155-15p diduga mampu menekan ekspresi gen yang berperan dalam aktivasi jalur inflamasi, sehingga secara tidak langsung menurunkan ekspresi MMP-9 dan COX-2. Dengan terhambatnya aktivitas kedua mediator tersebut, degradasi

kolagen dapat ditekan, sehingga struktur matriks ekstraseluler tetap terjaga. Selain itu, IL-10 yang disekresikan oleh EH-MSCs berperan sebagai sitokin antiinflamasi utama. IL-10 diketahui mampu menghambat aktivasi NF- κ B dan MAPK. Sehingga dapat menekan produksi sitokin inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 dan IL-8.⁸²⁻⁸³ Penurunan ekspresi COX-2 mengurangi pembentukan prostaglandin proinflamasi, sedangkan penurunan MMP-9 membatasi degradasi kolagen. Kondisi ini berkontribusi terhadap penghambatan collagen loss, meskipun jaringan sebelumnya mengalami kerusakan akibat paparan UVB.

Kelebihan signifikan lainnya adalah kemampuan HA berfungsi sebagai *scaffold* biologis yang mendukung retensi *exosome* di lokasi injeksi, sehingga memperpanjang waktu *exosome* berada di area target dan meningkatkan efektivitas terapi. Asam hialuronat, sebagai komponen utama matriks ekstraseluler, memiliki struktur hidrogel tiga dimensi yang biokompatibel dan dapat dimodifikasi untuk mengikat dan menahan vesikel kecil seperti *exosome*. Struktur hidrogel ini tidak hanya menyediakan lingkungan suportif untuk pertumbuhan jaringan tetapi juga bertindak sebagai reservoir lokal yang mengatur pelepasan *exosome* secara berkelanjutan sepanjang waktu.¹⁰¹⁻¹⁰² Secara keseluruhan, kombinasi EH-MSCs dan HA bekerja melalui mekanisme sinergis dengan menekan stres oksidatif, menghambat jalur inflamasi, serta menurunkan aktivitas enzim proteolitik yang merusak matriks ekstraseluler. Pendekatan ini memungkinkan pemulihan jaringan kulit yang lebih efektif dan mendekati

kondisi fisiologis normal dibandingkan terapi tunggal. Temuan ini menegaskan potensi kombinasi EH-MSCs dan HA sebagai strategi terapeutik berbasis sel yang menjanjikan dalam pencegahan dan perbaikan kerusakan kulit akibat paparan UVB.¹¹⁸

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan diantaranya adalah belum mengukur kadar oksidan dalam tubuh tikus akibat paparan UVB diantaranya adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS), sehingga penelitian lanjutan perlu dilakukan. Selain itu perlu dilakukan uji pengamatan *Masson Trichome* setelah perlakuan agar diketahui kondisi jaringan yang mengalami perbaikan sebagai manifestasi klinis dari penurunan ekspresi MMP-9 dan COX-2.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA secara injeksi subkutan terhadap ekspresi gen MMP-9 dan COX-2 pada tikus jantan galur Wistar model collagen loss akibat paparan UVB.
2. Terdapat perbedaan ekspresi gen MMP-9 pada tikus jantan galur Wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB yang diterapi kombinasi EH-MSCs dosis 200 μ L dan hyaluronic acid (HA) 2,4% b/v dosis 200 μ L dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.
3. Terdapat perbedaan ekspresi gen COX-2 pada tikus jantan galur Wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB yang diterapi kombinasi EH-MSCs dosis 200 μ L dan hyaluronic acid (HA) 2,4% b/v dosis 200 μ L dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

6.2. Saran

1. Pengukuran kadar oksidan tambahan dalam tubuh yang meliputi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Malondialdehyde* (MDA) untuk mengetahui tingkat stres oksidatif akibat paparan sinar UVB.
2. Pada penelitian selanjutnya dilakukan evaluasi perbaikan jaringan kulit melalui *Masson Trichrome* sehingga perbaikan kolagen dapat dinilai secara objektif dan terukur.

DAFTAR PUSTAKA

1. Son DJ, Jung JC, Choi YM, Ryu HY, Lee S, Davis BA. Wheat extract oil (WEO) attenuates UVB-induced photoaging via collagen synthesis in human keratinocytes and hairless mice. *Nutrients*. 2020;
2. Phipps KR, Lee HY, Kim H, Jeon B. Oral administration of a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract (BioCell Collagen®) reduces UVB-induced photoaging in mice. *J Funct Foods*. 2020;
3. Kang YM, Hong CH, Kang SH, Seo DS, Kim SO, Lee HY, et al. Anti-photoaging effect of plant extract fermented with *Lactobacillus buchneri* on CCD-986sk fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *J Funct Biomater*. 2020;
4. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. Vol. 14, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2013. p. 12222–48.
5. Green AC, Hughes MCB, McBride P, Fournanier A. Factors associated with premature skin aging (photoaging) before the age of 55: A population-based study. *Dermatology*. 2011;
6. Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain* (United Kingdom). 2019;23(5):874–83.
7. Dai Q, Wang Z, Wang X, Lian W, Ge Y, Song S, et al. Vorinostat attenuates UVB-induced skin senescence by modulating NF- κ B and mTOR signaling pathways. *Sci Rep*. 2025 Dec 1;15(1).
8. Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:610813.
9. Hu S, Li Z, Cores J, Huang K, Su T, Dinh PU, et al. Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging. *ACS Nano*. 2019 Oct 22;13(10):11273–82.
10. Liu W, Li L, Rong Y, Qian D, Chen J, Zhou Z, et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126. *Acta Biomater*. 2020 Feb 1;103:196–212.
11. Angelina J, Putra A, Trisnadi S, Hermansyah D, Setiawan E, Sumarawati T, 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* [Internet]. 2025 Feb 3;22(1):9–14. Available from: <https://medicinskiglasnik.ba/article/2142>

12. Tutuianu R, Rosca AM, Iacomini DM, 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. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 2;22(12).
13. Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *J Biomed Technol Res*. 2014;1(1):1–21.
14. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7(1).
15. Kim ES, Jeon HB, Lim H, Shin JH, Park SJ, Jo YK, et al. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibits melanogenesis by promoting proteasomal degradation of MITF. *PLoS One*. 2015;10(5):1–11.
16. Van De Walle GR, De Schauwer C, Fortier LA. Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Equine Clinical Immunology*. 2016;(2):297–310.
17. You Y, Tian Y, Yang Z, Shi J, Kwak KJ, Tong Y, et al. Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy. *Nat Biomed Eng*. 2023 Jul 1;7(7):887–900.
18. Yu H, Wu Y, Zhang B, Xiong M, Yi Y, Zhang Q, et al. Exosomes Derived from E2F1–/– Adipose-Derived Stem Cells Promote Skin Wound Healing via miR-130b-5p/TGFBR3 Axis. *Int J Nanomedicine*. 2023;18:6275–92.
19. Park AY, Lee JOK, Jang Y, Kim YJ, Lee JMIN, Kim SY, et al. Exosomes derived from human dermal fibroblasts protect against UVB-induced skin photoaging. *Int J Mol Med*. 2023 Dec 1;52(6).
20. Zhu H, Guo X, Zhang Y, Khan A, Pang Y, Song H, et al. 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 Apr 1;29(7).
21. Vo N, Vu DM, Tran NHB, Nguyen DDN, Phung PM, Nguyen HN, et al. Synergistic Anti-Aging Effects of Adipose-Derived Stem Cell Extracellular Vesicles Loaded With Natural Compounds. *J Cosmet Dermatol*. 2025 Feb 1;24(2).

22. Balasubramanian S, Thej C, Walvekar A, Swamynathan P, Gupta PK, Seetharam RN, et al. Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2017;07(01):99–117.
23. Sekton B. Matrix metalloproteinases – an overview. *Res Rep Biol*. 2010;1.
24. Pittayaprupek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
25. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC, et al. Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research*. 2012;32(6):428–38.
26. Hayami T, Kapila YL, Kapila S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix Biology* [Internet]. 2008;27(8):682–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2008.07.005>
27. Chan ZCK, Oentaryo MJ, Lee CW. MMP-mediated modulation of ECM environment during axonal growth and NMJ development. *Neurosci Lett* [Internet]. 2020;724:134822. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134822>
28. Hwang BM, Noh EM, Kim JS, Kim JM, Hwang JK, Kim HK, et al. Decursin inhibits UVB-induced MMP expression in human dermal fibroblasts via regulation of nuclear factor- κ B. *Int J Mol Med*. 2013;31(2):477–83.
29. Wen KC, Fan PC, Tsai SY, Shih IC, Chiang HM. *Ixora parviflora* protects against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs, MAP kinases, and COX-2 and by promoting type I procollagen synthesis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;
30. Tewari A, Grys K, Kollet J, Sarkany R, Young AR. Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: Potential implications for photoaging. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;
31. Parkinson LG, Toro A, Zhao H, Brown K, Tebbutt SJ, Granville DJ. Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular

matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation. *Aging Cell*. 2015;

32. Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ, et al. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med*. 2012;30(2):392–400.
33. Chiang HM, Chen HC, Chiu HH, Chen CW, Wang SM, Wen KC. *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after uvb exposure via Ros scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
34. Lee YR, Noh EM, Han JH, Kim JM, Hwang JK, Hwang BM, et al. Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2012;674(2–3):80–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.016>
35. Manka SW, Bihan D, Farndale RW. Structural studies of the MMP-3 interaction with triple-helical collagen introduce new roles for the enzyme in tissue remodelling. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
36. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients*. 2019;11(6).
37. Ryu JY, Na EJ. MMP expression alteration and MMP-1 production control by syringic acid via AP-1 mechanism. *Biomedical Dermatology*. 2018 Dec;2(1).
38. Hwang E, Lee DG, Park SH, Oh MS, Kim SY. Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type i and MMP-1 expression. *J Med Food*. 2014;17(9):985–95.
39. Vicentini FTMC, He T, Shao Y, Fonseca MJV, Verri WA, Fisher GJ, et al. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *J Dermatol Sci*. 2011;61(3):162–8.
40. Ujfaludi Z, Tuzesi A, Majoros H, Rothler B, Pankotai T, Boros IM. Coordinated activation of a cluster of MMP genes in response to UVB

- radiation. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20999-6>
41. Egrilmez MY, Koçturk S, Aktan S, Oktay G, Resmi H, Keskin HS, et al. Melatonin Prevents UVB-Induced Skin Photoaging by Inhibiting Oxidative Damage and MMP Expression through JNK/AP-1 Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts. *Life*. 2022 Jul 1;12(7).
 42. Subedi L, Lee TH, Wahedi HM, Baek SH, Kim SY. Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
 43. Gao S, Guo K, Chen Y, Zhao J, Jing R, Wang L, et al. Keratinocyte Growth Factor 2 Ameliorates UVB-Induced Skin Damage via Activating the AhR/Nrf2 Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2021 Jun 7;12.
 44. Jeayeng S, Wongkajornsilp A, Slominski AT, Jirawatnotai S, Sampattavanich S, Panich U. Nrf2 in keratinocytes modulates UVB-induced DNA damage and apoptosis in melanocytes through MAPK signaling. *Free Radic Biol Med*. 2017 Jul 1;108:918–28.
 45. Li X, Zhang L, Xu YW, Wang C, Zhao Y, Yu P, et al. The protective effects of 6-CySeCD with GPx activity against UVB-induced injury in HaCaT cells. *Australasian Journal of Dermatology*. 2013 May;54(2):120–5.
 46. Yao C, Lee DH, Oh JH, Kim MK, Kim KH, Park CH, et al. Poly(I : C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* [Internet]. 2015;80(1):54–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.06.017>
 47. Öksüz S, Ülkür E, Öncül O, Köse GT, Küçükodac Z, Urhan M. The effect of subcutaneous mesenchymal stem cell injection on stasis zone and apoptosis in an experimental burn model. *Plast Reconstr Surg*. 2013;131(3):463–71.
 48. Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, et al. Smad2 and smad3 are redundantly essential for the suppression of inos synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *Int Immunol*. 2012 Apr 1;24(4):253–65.
 49. Reyhani V, Tsioumpekou M, Van Wieringen T, Rask L, Lennartsson J, Rubin K. PDGF-BB enhances collagen gel contraction through a PI3K-PLC γ -PKC-cofilin pathway. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
 50. Agarwal P, Isringhausen S, Li H, Paterson AJ, He J, Gomariz Á, et al. Mesenchymal Niche-Specific Expression of Cxcl12 Controls Quiescence

- of Treatment-Resistant Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2019 May 2;24(5):769-784.e6.
51. Mei M, Weinong H, Jessica M, Keyoumas S, Christopher R S, Diane M F, et al. UVB induced ERK/AKT-dependent PTEN suppression promotes survival of epidermal keratinocytes. *Physiol Behav*. 2016;176(3):139–48.
 52. Ooki A, Del Carmen Rodriguez Pena M, Marchionni L, Dinalankara W, Begum A, Hahn NM, et al. YAP1 and COX2 coordinately regulate urothelial cancer stem-like cells. *Cancer Res*. 2018;78(1):168–81.
 53. Zhao Y, Yang Y, Liu M, Qin X, Yu X, Zhao H, et al. COX-2 is required to mediate crosstalk of ROS-dependent activation of MAPK/NF- κ B signaling with pro-inflammatory response and defense-related NO enhancement during challenge of macrophage-like cell line with *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Apr 1;16(4).
 54. Wu M, Guan J, Li C, Gunter S, Nusrat L, Ng S, et al. Aberrantly activated Cox-2 and Wnt signaling interact to maintain cancer stem cells in glioblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(47):82217–30.
 55. Liu M, Yang SC, Sharma S, Luo J, Cui X, Peebles KA, et al. EGFR signaling is required for TGF- β 1-mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(5):578–88.
 56. Yusup G, Akutsu Y, Mutallip M, Qin W, Hu X, Komatsu-Akimoto A, et al. A COX-2 inhibitor enhances the antitumor effects of chemotherapy and radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014;44(4):1146–52.
 57. Fuller B. Role of PGE-2 and Other Inflammatory Mediators in Skin Aging and Their Inhibition by Topical Natural Anti-Inflammatories. *Cosmetics*. 2019 Mar 1;6(1):1–28.
 58. Park EK, Lee HJ, Lee H, Kim JH, Hwang J, Koo J Il, et al. The anti-wrinkle mechanism of melatonin in UVB treated HaCaT keratinocytes and hairless mice via inhibition of ROS and sonic hedgehog mediated inflammatory proteins. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 8;19(7).
 59. Lee SE, Park SH, Oh SW, Yoo JA, Kwon K, Park SJ, et al. Beauvericin inhibits melanogenesis by regulating cAMP/PKA/CREB and LXR- α /p38 MAPK-mediated pathways. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–12.
 60. Chen B, Yu L, Wu J, Qiao K, Cui L, Qu H, et al. Effects of Collagen Hydrolysate From Large Hybrid Sturgeon on Mitigating Ultraviolet B-Induced Photodamage. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Jun 27;10.

61. Kumagai CM, Martinez RM, Colombo BB, Saito P, Pinto IC, Rodrigues CCA, et al. Topical Administration of 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 Using a Nonionic Cream: Effect on UVB-Induced Skin Oxidative, Inflammatory, and Histopathological Modifications in Mice. *Mediators Inflamm.* 2021;2021.
62. Zhao C, Wu S, Wang H. Medicinal Plant Extracts Targeting UV-Induced Skin Damage: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. Vol. 26, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025.
63. Pardo A, Selman M. MMP-1: The elder of the family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2005;37(2):283–8.
64. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 1998;93(3):411–22.
65. Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S, et al. Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats. *Open Access Maced J Med Sci.* 2022 Dec 15;10(A):1–7.
66. Lozito TP, Tuan RS. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *J Cell Physiol.* 2011 Feb;226(2):385–96.
67. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016(Figure 1).
68. Liu CM, Sun YZ, Sun JM, Ma JQ, Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 2012;1820(10):1693–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.011>
69. Wang Z, Yang B, Chen X, Zhou Q, Li H, Chen S, et al. Nobiletin Regulates ROS/ADMA/DDAHII/eNOS/NO Pathway and Alleviates Vascular Endothelium Injury by Iron Overload. *Biol Trace Elem Res.* 2020;
70. Lin P, Shi H yu, Lu Y ying, Lin J. Centella asiatica alleviates psoriasis through JAK/STAT3-mediated inflammation: An in vitro and in vivo study. *J Ethnopharmacol.* 2023 Dec 5;317.
71. Choi H, Choi H, Han J, Jin SH, Park JY, Shin DW, et al. IL-4 inhibits the melanogenesis of normal human melanocytes through the JAK2-STAT6

- signaling pathway. *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 2013;133(2):528–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.331>
72. Ren Y, Yang J, Li M, Huang N, Chen Y, Wu X, et al. Viral IL-10 promotes cell proliferation and cell cycle progression via JAK2/STAT3 signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 2020 Nov 1;67(6):929–38.
 73. Sun Y, Liu L, Wang Y, He A, Hu H, Zhang J, et al. Curcumin inhibits the proliferation and invasion of MG-63 cells through inactivation of the p-JAK2/ p-STAT3 pathway. *Onco Targets Ther*. 2019;12:2011–21.
 74. Deng G, Li K, Chen S, Chen P, Zheng H, Yu BIN, et al. Interleukin - 10 promotes proliferation and migration , and inhibits tendon differentiation via the JAK / Stat3 pathway in tendon - derived stem cells in vitro. 2018;5044–52.
 75. Kim T, Hyun CG. Imperatorin Positively Regulates Melanogenesis through Signaling Pathways Involving PKA/CREB, ERK, AKT, and GSK3 β /Catenin. *Molecules*. 2022 Oct 1;27(19).
 76. Ja Choi Y, Mi Moon K, Wung Chung K, Won Jeong J, Park D, Hyun Kim D, et al. The underlying mechanism of proinflammatory NF- κ B activation by the mTORC2/Akt/IKK α pathway during skin aging [Internet]. Vol. 7. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
 77. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells*. 2019;12(2):218–26.
 78. Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems*. 2018;
 79. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep*. 2016;2(2):168–73.
 80. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
 81. Putra A. Basic Molecular Stem Cell. Semarang: Unissula Press; 2019.
 82. Chang L, Fan WW, Yuan HL, Liu X, Wang Q, Ruan GP, et al. Role of umbilical cord mesenchymal stromal cells in skin rejuvenation. Vol. 9, *npj Regenerative Medicine*. Nature Research; 2024.

83. Park YM, Lee MJ, Jeon SH, Hrůzová D. In vitro effects of conditioned medium from bioreactor cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on skin-derived cell lines. *Regen Ther.* 2021;18:281–91.
84. Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(18):6098–107.
85. Chattopadhyay S, Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers.* 2014.
86. Jang JY, Min JH, Chae YH, Baek JY, Wang S Bin, Park SJ, et al. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via shp-2 oxidation. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jun 1;20(16):2528–40.
87. Wang H, Yan X, Shen L, Li S, Lin Y, Wang S, et al. Acceleration of wound healing in acute full-thickness skin wounds using a collagen-binding peptide with an affinity for MSCs. *Burns Trauma.* 2014 Oct 1;2(4):181–6.
88. Miescher I, Rieber J, Calcagni M, Buschmann J. In Vitro and In Vivo Effects of IGF-1 Delivery Strategies on Tendon Healing: A Review. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2023.
89. Chen PC, Kuo YC, Chuong CM, Huang YH. Niche Modulation of IGF-1R Signaling: Its Role in Stem Cell Pluripotency, Cancer Reprogramming, and Therapeutic Applications. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8(January).
90. Zhang X, Hu F, Li J, Chen L, Mao Y fei, Li Q bo, et al. IGF-1 inhibits inflammation and accelerates angiogenesis via Ras/PI3K/IKK/NF- κ B signaling pathways to promote wound healing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2024 Sep 1;200.
91. Putri RS, Putra A, Chodidjah, Darlan DM, Trisnadi S, Thomas S, et al. *Clitorea ternatea* flower extract induces platelet-derived growth factor (Pdgf) and gpx gene overexpression in ultraviolet (uv) b irradiationinduced collagen loss. *Med Glas.* 2023 Feb 1;20(1):15–21.
92. Piechota M, Sunderland P, Wysocka A, Nalberczak M, Sliwinska MA, Radwanska K, et al. Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget.* 2016;7(49):81099–109.
93. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc [Internet].*

2009;4(12):1798–806. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.191>

94. Hansel C, Jendrossek V, Klein D. Cellular senescence in the lung: The central role of senescent epithelial cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):1–21.
95. Molnarfi N, Bjarnadóttir K, Benkhoucha M, Juillard C, Lalive PH. Activation of human B cells negatively regulates TGF- β 1 production. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2017;14(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-017-0798-5>
96. Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology.* 2007;179(6):1311–23.
97. Liarte S. Role of TGF- β in Skin Chronic Wounds : A Keratinocyte Perspective. 2020;
98. He X, Hu Y, Wu Y, Luo Y, Feng H, Wu Q, et al. Hyaluronic acid modified chuanxiong oil liposomes as a novel therapeutic agent for photoaging prevention. *Sci Rep.* 2025 Dec 1;15(1).
99. Edwards PC, Fantasia JE. Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. Vol. 2, *Clinical Interventions in Aging.* 2007.
100. Hu L, Nomura S, Sato Y, Takagi K, Ishii T, Honma Y, et al. Anti-inflammatory effects of differential molecular weight Hyaluronic acids on UVB-induced calprotectin-mediated keratinocyte inflammation. *J Dermatol Sci.* 2022 Jul 1;107(1):24–31.
101. Robati RM, Moeineddin F, Almasi-Nasrabadi M. The Risk of Skin Necrosis Following Hyaluronic Acid Filler Injection in Patients With a History of Cosmetic Rhinoplasty. *Aesthet Surg J.* 2018 Jul 13;38(8):883–8.
102. Corrêa MEAB, dos Santos Haupenthal DP, Mendes C, Zaccaron RP, de Roch Casagrande L, Venturini LM, et al. Effects of Percutaneous Collagen Induction Therapy Associated with Hyaluronic Acid on Inflammatory Response, Oxidative Stress, and Collagen Production. *Inflammation.* 2020 Dec 1;43(6):2232–44.
103. Buechner N, Schroeder P, Jakob S, Kunze K, Maresch T, Calles C, et al. Changes of MMP-1 and collagen type I α 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp Gerontol.* 2008;43(7):633–7.
104. Salehi F, Behboudi H, Kavooosi G, Ardestani SK. Oxidative DNA damage induced by ROS-modulating agents with the ability to target DNA: A

- comparison of the biological characteristics of citrus pectin and apple pectin. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-32308-2>
105. Wölfl U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(9):1081–93.
 106. Shams F, Moravvej H, Hosseinzadeh S, Mostafavi E, Bayat H, Kazemi B, et al. Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: in vitro and in vivo studies. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).
 107. Brand RM, Wipf P, Durham A, Epperly MW, Greenberger JS, Falo LD. Targeting mitochondrial oxidative stress to mitigate UV-induced skin damage. *Front Pharmacol*. 2018;9(AUG):1–10.
 108. Baumann D, Drebant J, Hägele T, Burger L, Serger C, Lauenstein C, et al. P38 MAPK signaling in M1 macrophages results in selective elimination of M2 macrophages by MEK inhibition. *J Immunother Cancer*. 2021 Jul 20;9(7).
 109. Shi J, Li J, Guan H, Cai W, Bai X, Fang X, et al. Anti-fibrotic actions of interleukin-10 against hypertrophic scarring by activation of PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways in scar-forming fibroblasts. *PLoS One*. 2014;
 110. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. Vol. 11, *Journal of Inflammation Research*. Dove Medical Press Ltd; 2018. p. 407–19.
 111. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Anna N, et al. The Role of TNF- α Induced MSCs on Suppressive Inflammation.pdf. 2018;6(10):1779–83.
 112. Mirastschijski U, Lupše B, Maedler K, Sarma B, Radtke A, Belge G, et al. Matrix metalloproteinase-3 is key effector of TNF- α -induced collagen degradation in skin. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):1–14.
 113. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009 Apr;129(4):994–1001.

114. Zhang Z, Huang S, Wu S, Qi J, Li W, Liu S, et al. Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE2. *EBioMedicine*. 2019;45:341–50.
115. Fan Y, Jeong JH, You GY, Park JU, Choi TH, Kim S. An Experimental Model Design for Photoaging. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2015;
116. Darlan DM, Munir D, Putra A, Jusuf NK. MSCs-released TGF β 1 generate CD4+CD25+Foxp3+ in T-reg cells of human SLE PBMC. *Journal of the Formosan Medical Association* [Internet]. 2021;120(1):602–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.06.028>
117. 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):177–82.
118. Yang Y, He Y, Xing H, Zhao Z, Wang J, Li S, et al. Hyaluronic acid-liposomes hybridized with HucMSC exosomes for enhanced exosomes transdermal delivery and acute skin photodamage repair. *Int J Biol Macromol*. 2025 May 1;306. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.141606 PubMed PMID: 40024399.
119. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2013. p. 303–6. doi:10.4103/0976-500X.119726 PubMed PMID: 24250214.

