

**PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS DAN *HYALURONIC*
ACID TERHADAP EKSPRESI GEN COL1A1
DAN TIMP-1**

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

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Qonita Wachidah

MBK. 24.24.010519

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU 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 COL1A1
DAN TIMP-1**

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

Disusun oleh:

Qonita Wachidah
MBK. 24.24.010519

Telah di pertahankan di depan tim penguji
Pada 12 Februari 2026
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,



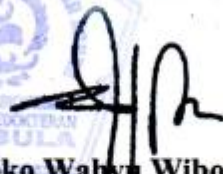
Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B. FINACS
NIK. 210113160

Pembimbing II,



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. 210198046

LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI

Laporan tesis dengan judul "PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* DAN *HYALURONIC ACID* TERHADAP EKSPRESI GEN COL1A1 DAN TIMP-1 (Studi Eksperimental pada Tikus Wistar Model *Collagen Loss* Akibat Paparan UVB)" ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 12 Februari 2026

NO	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1.	Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes	Penguji I	
2.	Dr. dr. 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.



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Qonita Wachidah
Tempat, tanggal lahir : Surabaya, 11 Oktober 1989
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

TK Segar Bangkalan : Lulus tahun 1995
SD Lab UM Malang : Lulus tahun 2001
MTsN 1 Malang : Lulus tahun 2004
SMAN 1 Malang : Lulus tahun 2007
S1 Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman: Lulus tahun 2011
Profesi Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman: Lulus tahun 2013
Magister S2 Ilmu Biomedik UNISSULA Semarang (2024 – sekarang)

C. Riwayat Keluarga

Nama Ayah : Achmad Budi Utomo
Nama Ibu : Dwirini Esa Darmawati
Nama Anak : 1. Rania Hanifa
2. M. Ali Rayyan Ashiddiq
3. Abdurrahman Hassan Al Faruq

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan Puji dan Syukur ke Hadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH KOMBINASI *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* DAN *HYALURONIC ACID* TERHADAP EKSPRESI GEN COL1A1 DAN TIMP-1 (Studi Eksperimental pada Tikus Wistar Model *Collagen Loss* akibat Paparan UVB)**. Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S2) 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 selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang sekaligus pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.

3. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M. Kes selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Dr. Suparmi, S.Si., M.Si (ERT) selaku dosen pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes selaku dewan penguji I yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
6. Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes selaku dewan penguji II yang telah memberikan banyak saran dalam penyelesaian tesis.
7. Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, SKM., M. Kes selaku dewan penguji III yang telah memberikan banyak saran dalam penyelesaian tesis.
8. Seluruh tenaga pendidik dan staf administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, Februari 2026
Penulis,

Qonita Wachidah

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI	iii
PERNYATAAN	iv
RIWAYAT HIDUP	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.3.1. Tujuan Umum	6
1.3.2. Tujuan Khusus	6
1.4. Manfaat Penelitian	7
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	7
1.4.2. Manfaat Praktis	7
1.5. Originalitas Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	12
2.1. <i>Collagen</i>	12
2.1.1. Definisi dan Tipe <i>Collagen</i>	12
2.1.2. Sintesis dan Degradasi <i>Collagen</i>	13
2.1.3. Peran <i>Collagen</i> dalam Integritas Jaringan dan <i>Remodelling</i>	14
2.1.4. Peran <i>Collagen</i> dan Kehilangannya (<i>Collagen Loss</i>) dalam	

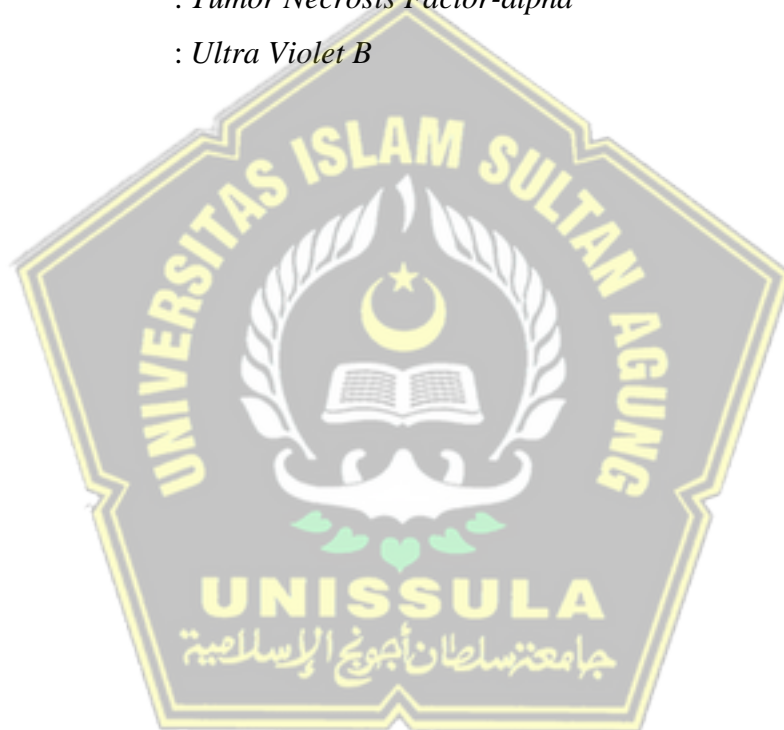
<i>Photoaging</i>	15
2.2. Gen <i>Collagen</i> Tipe I Alfa 1 (COL1A1).....	17
2.2.1. Struktur COL1A1	17
2.2.2. Regulasi Sintesis dan Degradasi COL1A1	18
2.2.3. Aktivasi dan Mekanisme Seluler COL1A1 pada Kulit yang Terpapar UVB dan Penurunan <i>Collagen</i>	19
2.3. <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1</i> (TIMP-1).....	21
2.3.1. Definisi dan Fungsi TIMP-1	21
2.3.2. Aktivasi dan Mekanisme Seluler TIMP-1 pada Kulit yang Terpapar UVB dan Penurunan <i>Collagen</i>	24
2.4. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs).....	26
2.4.1. Definisi MSCs	26
2.4.2. Peran MSCs	27
2.4.3. Konsep <i>Small Molecule Growth Factor</i> MSCs	28
2.4.4. Induksi <i>Small Molecule</i> dan <i>Exosome</i> MSCs	30
2.5. <i>Hyaluronic Acid</i> (HA).....	31
2.5.2. Struktur Molekul HA.....	32
2.5.3. Mekanisme Molekuler HA dalam Menginduksi Produksi <i>Collagen</i>	35
2.5.4. Aplikasi HA pada Kulit	36
BAB III KERANGKA TEORI	38
3.1. Kerangka Teori	38
3.2. Kerangka Konsep	44
3.3. Hipotesis	44
BAB IV METODE PENELITIAN	45
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	45
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	46
4.2.1. Variabel Penelitian.....	46
4.2.2. Definisi Operasional	46
4.3. Populasi dan Sampel Penelitian.....	49
4.3.1. Sampel Penelitian	49

4.3.2.	Kriteria Penelitian	49
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	50
4.3.4.	Besar Sampel	51
4.4.	Alat dan Bahan	51
4.4.1.	Alat	51
4.4.2.	Bahan	52
4.5.	Cara Penelitian.....	52
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	52
4.5.2.	Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan.....	52
4.5.3.	Pengambilan Sampel Jaringan	53
4.5.4.	Validasi <i>Collagen Loss</i> akibat Paparan UVB Menggunakan Pengecatan <i>Masson Thrichrome</i>	53
4.5.5.	Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen COL1A1 dan TIMP-1 dengan RT-qPCR.....	55
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	56
4.7.	Analisis Data.....	56
4.8.	Alur Penelitian	58
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	59
5.1.	Hasil Penelitian.....	59
5.1.1.	Hasil Validasi MSCs.....	59
5.1.2.	Hasil Validasi <i>Collagen Loss</i>	63
5.1.3.	Ekspresi Gen COL1A1 pada Jaringan Kulit.....	66
5.1.4.	Ekspresi Gen TIMP-1 pada Jaringan Kulit.....	69
5.2.	Pembahasan.....	72
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	78
6.1.	Kesimpulan	78
6.2.	Saran	79
DAFTAR PUSTAKA	80	
LAMPIRAN.....	87	

DAFTAR SINGKATAN

ASC-EVs	: <i>Adipose-derived Stem Cell Extracellular Vesicles</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
COL1A1	: <i>Collagen I Alpha I</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CHPs	: <i>Collagen Hybridizing Peptides</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
EPA	: <i>Erythroid Progenitor Activation</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
GAG	: <i>Glycosaminoglycan</i>
GAPDH	: <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HA	: <i>Hyaluronic Acid</i>
HDF	: <i>Human Dermal Fibroblasts</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
JNK	: <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinases</i>
MDa	: <i>Mega Dalton</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
miR	: <i>Micro RNA</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NRF2	: <i>Nuclear Factor-Erythroid2-Related Factor 2</i>
RHAMM	: <i>Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>

RT-qPCR	: <i>Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
Smad	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic</i>
SOD	: <i>Super Oxide Dismutase</i>
STAT	: <i>Signal Transduction and Transcription</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta Receptor</i>
TIMP-1	: <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UVB	: <i>Ultra Violet B</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	7
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Parametrik pada ekspresi COL1A1	66
Tabel 5.2.	Perbedaan Rerata Ekspresi COL1A1 Antar 2 Kelompok	67
Tabel 5.3.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Parametrik pada ekspresi TIMP-1	70



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Patogenesis Photoaging	16
Gambar 2.2.	Jalur Pensinyalan TGF- β /Smad akibat Paparan UVB.....	20
Gambar 2.3.	Model Kristalografi kompleks MMP–TIMP	24
Gambar 2.5.	Komponen yang dikeluarkan oleh MSCs.....	31
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	43
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	44
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian	45
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	58
Gambar 5.1.	(A) Isolasi MSCs dengan konfluensi 80% didapatkan gambaran sel berbentuk <i>spindle-like</i> (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Analisis <i>flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90, dan CD29.	60
Gambar 5.2.	Kemampuan diferensiasi MSCs menjadi osteosit setelah pewarnaan <i>Alizarin Red</i> dengan perbesaran 200x (A) dan kondrosit setelah pewarnaan <i>Alcian Blue</i> dengan perbesaran 100 \times (B).	61
Gambar 5.3.	Analisis EH-MSCs menggunakan <i>Flow Cytometry</i> (A). <i>Dynamic range</i> korelasi linear <i>exosome</i> dengan <i>Mean Fluorescence Intensity</i> (MFI) (B). Tabel hasil kuantifikasi <i>exosome</i> (C).	63
Gambar 5.4.	Hasil pengamatan makroskopis kulit tikus sebelum dipapar UVB (A) dan setelah dipapar UVB selama 14 hari (B). Hasil pengamatan histopatologi preparat jaringan kulit tikus dengan pewarnaan <i>Masson Trichrome</i> sebelum dipapar UVB (C) dan setelah dipapar UVB selama 14 hari (D).....	65
Gambar 5.5.	Ekspresi Relatif gen COL1A1 pada jaringan kulit tikus model <i>collagen loss</i> pada semua kelompok. *p<0.05	69
Gambar 5.6.	Ekspresi Relatif gen TIMP-1 pada jaringan kulit tikus model <i>collagen loss</i> pada semua kelompok. *p<0.05	71

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearance</i>	87
Lampiran 2.	Surat Izin Penelitian	88
Lampiran 3.	Surat Keterangan Kesehatan Hewan	89
Lampiran 4.	Foto Penelitian.....	90
Lampiran 5.	Hasil Analisis SPSS Deskriptif	92
Lampiran 6.	Surat Keterangan Penelitian dan Hasil Analisis	98



ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan ultraviolet-B (UVB) berperan dalam terjadinya *collagen loss* akibat proses *photoaging*. *Exosome hypoxia mesenchymal stem cells* (EH-MSCs) dan *hyaluronic acid* (HA) telah banyak dikaji sebagai terapi potensial. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus Wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

Metode: Penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group* dilakukan menggunakan tikus Wistar yang mengalami *collagen loss* akibat paparan UVB. Hewan coba dibagi secara acak menjadi kelompok kontrol sehat, kelompok UVB tanpa perlakuan, kelompok perlakuan EH-MSCs, HA, dan kombinasi EH-MSCs+HA. Ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 dianalisis menggunakan metode qRT-PCR.

Hasil: Ekspresi gen COL1A1 berturut-turut sebesar $1,04 \pm 0,32$; $0,48 \pm 0,08$; $0,68 \pm 0,16$; $0,90 \pm 0,33$; dan $1,03 \pm 0,30$ pada kelompok sehat, UVB+NaCl, UVB+HA, UVB+EH-MSCs, dan UVB+EH-MSCs+HA. Ekspresi gen TIMP-1 masing-masing sebesar $1,08 \pm 0,45$; $0,37 \pm 0,14$; $0,55 \pm 0,02$; $0,79 \pm 0,28$; dan $0,99 \pm 0,45$. Ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 akibat paparan UVB lebih rendah dibandingkan kelompok sehat. Terapi kombinasi EH-MSCs dan HA menunjukkan ekspresi gen tertinggi di antara seluruh kelompok yang dipapar UVB dengan hasil uji *One Way ANOVA* yang signifikan ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Kombinasi EH-MSCs dan HA berpengaruh terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus Wistar model *collagen loss*.

Kata kunci: *collagen loss*, UVB, *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*, *Hyaluronic Acid*, COL1A1, TIMP-1.

ABSTRACT

Background: Ultraviolet-B (UVB) exposure plays a major role in collagen loss skin through photoaging process. Hypoxia mesenchymal stem cell-derived exosomes (EH-MSCs) and hyaluronic acid (HA) have been widely investigated as potential therapy. This study aimed to evaluate the effect of combined EH-MSCs and HA on COL1A1 and TIMP-1 gene expression in UVB-induced collagen loss model in Wistar rats.

Methods: An experimental post-test only control group design was conducted using Wistar rats exposed to repeated UVB irradiation for two weeks to induce collagen loss. Animals were randomly assigned into healthy control, UVB-exposed untreated, and treatment groups receiving EH-MSCs, HA, or a combination of EH-MSCs and HA. Gene expression levels of COL1A1 and TIMP-1 were analyzed using quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

Results: Mean COL1A1 levels were 1.04 ± 0.32 , 0.48 ± 0.08 , 0.68 ± 0.16 , 0.90 ± 0.33 , and 1.03 ± 0.30 in the control, UVB+NaCl, UVB+HA, UVB+EH-MSCs, and UVB+EH-MSCs+HA groups, respectively. TIMP-1 expression levels were 1.08 ± 0.45 , 0.37 ± 0.14 , 0.55 ± 0.02 , 0.79 ± 0.28 , and 0.99 ± 0.45 . UVB exposure significantly reduced both gene expressions compared with healthy controls. One Way ANOVA test of combination therapy demonstrated the greatest improvement among UVB-exposed groups ($p < 0.05$).

Conclusion: Combined EH-MSCs and HA significantly modulated gene expression level of COL1A1 and TIMP-1.

Keywords: collagen loss, UVB, hypoxia mesenchymal stem cells-derived exosomes, hyaluronic acid, COL1A1, TIMP-1.

UNISSULA
جامعة سلطان أبوبوع الإسلامية

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Collagen loss atau kehilangan *collagen* merupakan salah satu tanda dari penuaan (*aging*) pada kulit yang ditandai dengan garis halus, tekstur kulit kasar, pori-pori membesar, dan warna kulit tidak merata.¹ Paparan ultraviolet B (UVB) dari cahaya matahari menjadi salah satu penyebab *collagen loss*, dimana UVB menyebabkan stress oksidatif. Peningkatan stres oksidatif menyebabkan peningkatan ekspresi *matrix metalloproteinases* (MMPs), penurunan ekspresi gen *collagen Type I Alpha 1 Chain* (COL1A1), dan penurunan ekspresi *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) sehingga memperparah kehilangan *collagen* pada jaringan kulit.^{2,3} *Collagen loss* yang terus-menerus dapat menyebabkan kerutan, kulit mengendur, dan kehilangan elastisitas kulit. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk mengatasi *collagen loss* akibat UVB. Sampai saat ini kajian tentang terapi *collagen loss* akibat UVB yang mengamati ekspresi COL1A1 dan TIMPs belum banyak dilakukan.

Terapi yang sudah ada menggunakan HA, di mana HA bersifat biokompatibel, higroskopis, dan menjaga kelembaban dan elastisitas kulit. HA mendukung regenerasi jaringan dengan menciptakan lingkungan matriks yang kondusif bagi migrasi sel, proliferasi fibroblas, dan deposisi *collagen* baru. Terapi dengan HA tunggal tidak secara langsung memperbaiki atau meregenerasi matriks *collagen* yang rusak secara

signifikan. Pada kasus *collagen loss* berat akibat penuaan atau kerusakan lingkungan, terapi tunggal ini kurang cukup untuk mengembalikan elastisitas dan kekenyalan kulit secara maksimal. Selain itu, efek hidrasi dan stimulasi *collagen* yang terjadi akibat terapi HA tunggal cenderung bersifat sementara dan kurang mampu merangsang produksi *collagen* baru secara optimal dalam jangka panjang. Hal ini menyebabkan perlunya terapi berulang atau kombinasi dengan bahan aktif lain agar hasil lebih tahan lama.^{4,5}

Gen COL1A1 merupakan protein yang mengkode rantai $\alpha 1$ dari *collagen* tipe I, yang merupakan komponen utama matriks ekstraseluler kulit, tulang, dan jaringan ikat. *Collagen* tipe I tersusun dari dua rantai $\alpha 1$ (produk COL1A1) dan satu rantai $\alpha 2$ (produk COL1A2).⁶ Protein ini berfungsi memberikan kekuatan tarik dan stabilitas struktural jaringan, sedangkan TIMPs merupakan sekelompok protein penghambat alami dari *MMPs*. Secara fisiologis, TIMPs menjaga keseimbangan antara degradasi dan sintesis jaringan ikat. Bila kadar TIMPs turun atau aktivitas *MMPs* meningkat secara berlebihan, jaringan akan mengalami kerusakan.⁷ Paparan UVB yang terus-menerus dapat menekan transkripsi COL1A1 melalui aktivasi jalur AP-1 yang menghambat sinyal TGF- β /Smad, dan menurunkan ekspresi TIMPs sehingga menyebabkan penurunan sintesis *collagen*.^{6,7}

Studi epidemiologi telah secara konsisten menunjukkan bahwa prevalensi *collagen loss* akibat paparan UVB cenderung meningkat, terutama di wilayah dengan tingkat paparan matahari yang tinggi termasuk

Indonesia. Populasi yang tinggal di daerah tropis atau yang sering terpapar sinar matahari secara langsung memiliki resiko lebih besar untuk mengalami kehilangan *collagen* yang signifikan.⁸ Indonesia merupakan salah satu negara tropis dengan paparan sinar ultraviolet matahari sepanjang tahun, sehingga penduduk Indonesia sangat rentan terhadap terjadinya *collagen loss*.⁹ Suatu studi pada tahun 2025 menunjukkan bahwa paparan sinar UVB dosis tinggi sebesar 750 mJ/cm^2 menurunkan *collagen* pada 50% subjek penelitian.¹⁰ Hal ini mendorong pengembangan agen *cosmoceutical* yang aman dan efektif untuk mengatasi *collagen loss*.

Saat ini, terapi *collagen loss* diarahkan ke *exosome mesenchymal stem cells* (MSCs), yaitu vesikel ekstraseluler yang mengandung miRNA, protein, serta faktor pertumbuhan yang berperan dalam perbaikan jaringan. *Exosome* terbukti mampu meningkatkan aktivitas TIMPs, meningkatkan ekspresi COL1A1, serta mengembalikan homeostasis jaringan kulit.¹¹ Kondisi *hypoxia* pada kultur MSCs meningkatkan kualitas dan kandungan bioaktif *exosome*, termasuk molekul protektif yang memperkuat fungsi regeneratifnya. Hasil penelitian terdahulu membuktikan bahwa *exosome* MSCs dari tanduk rusa meningkatkan proliferasi sel kulit dan angiogenesis, memperbaiki struktur *collagen* dengan meningkatkan rasio *collagen* tipe I terhadap tipe III di kulit tikus, mempercepat penyembuhan luka kulit dan mengurangi pembentukan jaringan parut.¹² Studi lain membahas potensi *exosome* MSCs dalam meningkatkan produksi *collagen* tipe I (COL1A1), mengurangi ekspresi MMP, serta meningkatkan TIMP,

yang berkontribusi memperbaiki keseimbangan matriks ekstraseluler dan mengatasi *collagen loss* pada kulit.¹³ Studi ini juga mengulas mekanisme molekuler dalam *exosome* MSCs untuk regenerasi kulit pada model tikus. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *exosome* yang berasal dari *mesenchymal stem cells* (MSCs) memiliki potensi besar dalam memperbaiki kerusakan kulit akibat paparan UVB. Mekanisme ini terutama melalui peningkatan ekspresi COL1A1 sebagai komponen utama *collagen* tipe I, serta pengaturan keseimbangan *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP) terhadap *matrix metalloproteinase* (MMP) yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler.^{11,13-15} Sementara itu, *hyaluronic acid* (HA) berfungsi memperkuat struktur matriks dermis melalui peningkatan hidrasi jaringan dan perlindungan terhadap *collagen*, sehingga mampu mengurangi degradasi serta memperbaiki stabilitas matriks kulit.^{16,17} Kombinasi *exosome hypoxia* MSCs dengan biomaterial seperti HA terbukti memberikan efek sinergis, di mana HA berfungsi sebagai *scaffold* alami yang memperkuat efek terapeutik *exosome* maupun faktor pertumbuhan lain.¹¹ Pengembangan terapi kombinasi ini perlu dilakukan mengingat studi yang mengeksplorasi kombinasi *exosome hypoxia* MSCs dengan HA dalam konteks *collagen loss* akibat UVB masih terbatas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid* terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini

adalah tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm^2 yang dipapar sekitar 8 menit/hari selama 5 kali perminggu selama 2 minggu. HA dan *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* diberikan dalam bentuk secara injeksi subkutan di daerah yang dipapar UVB masing-masing sebanyak $200 \mu\text{L}$, merujuk pada penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa formulasi MSC-Exo yang dimuat ke dalam *hydrogel* berbasis HA dengan dosis $200 \mu\text{L}$ yang disuntikkan secara subkutan mempercepat regenerasi jaringan yang lebih efektif dan fungsional dibandingkan dengan yang diinjeksi HA tunggal.¹⁸ Ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 kemudian diukur menggunakan metode qRT-PCR. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi dasar pengembangan strategi terapi inovatif berbasis kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid*, yang lebih efektif dibandingkan terapi konvensional berbasis obat kimia.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah "Apakah terdapat pengaruh kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid* terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus 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 *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid* terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain untuk:

- a. Mengukur ekspresi gen COL1A1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB dan diberi kombinasi *exosome Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid*.
- b. Mengukur ekspresi gen TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB dan diberi kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid*.
- c. Membandingkan ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB dan diberi kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid* dibandingkan dengan kelompok kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi dan dasar penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid* terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendorong pengembangan agen *cosmoceutical* dari kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dan *Hyaluronic Acid* sebagai terapi *collagen loss* akibat paparan UVB.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
1.	Chung, et al., 2001 ¹⁹	<i>Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin In Vivo</i>	<i>In vivo</i>	Ekspresi mRNA <i>procollagen α1(I)</i> meningkat pada kulit yang menua akibat sinar matahari dibandingkan dengan kulit manusia yang terlindungi dari sinar matahari <i>secara in vivo</i>
2.	Hu, et al., 2016 ²⁰	<i>Exosomes Derived from Human Adipose Mensenchymal Stem Cells (AMSC-Exo) Accelerates Cutaneous Wound Healing via OptimizingThe</i>	<i>In vitro in vivo</i>	<i>Secara in vivo</i> , (AMSC-Exo) dapat meningkatkan ekspresi <i>collagen I</i> dan tipe III pada tahap awal penyembuhan luka

<i>Characteristics of Fibroblasts</i>				
3.	Shiqi, et al., 2019 ²¹	<i>Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast (HDF-Exos) Spheroids Ameliorates Skin Photoaging</i>	<i>In vivo</i>	<i>HDF-Exos</i> menyebabkan peningkatan ekspresi <i>procollagen</i> 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).
4.	Wang, et al., 2019 ²²	<i>Engineering Bioactive Self-Healing Antibacterial Exosomes Hydrogel for Promoting Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration</i>	<i>In vivo</i>	AMSCs-exo yang dimuat ke dalam hidrogel FHE berbasis polipeptida menstimulasi pembentukan jaringan granulasi, deposisi <i>collagen</i> , dan re-epitelisasi kulit.
5.	Peng, et al., 2020 ²³	<i>Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Stem Cells (ADSC-EV) Ameliorate Ultraviolet B-Induced Skin Photoaging by Attenuating Reactive Oxygen Species Production and Inflammation</i>	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Secara <i>in vivo</i> , ADSC-EV memperbaiki penuaan dini akibat UVB dengan mengurangi produksi <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) dan infiltrasi makrofag serta mendorong proliferasi sel epidermis
6.	Zhu, et al., 2024 ²⁴	<i>The Combined Anti-Aging Effect of Hydrolyzed Collagen Oligopeptides and Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (Exo-UCMSCs) on Human Skin Fibroblasts</i>	<i>In vitro</i>	Kombinasi <i>collagen</i> oligopeptida terhidrolisis dan (Exo-UCMSCs) secara sinergis meningkatkan proliferasi dan migrasi fibroblast dengan meningkatkan <i>collagen type</i> I, elastin, fibronectin, katalase, dan SOD1.
7.	Vo, et al., 2025 ²⁵	<i>Synergistic Anti-Aging Effects of Adipose-Derived</i>	<i>In vitro</i>	Kombinasi ASC-EVs dan senyawa alami <i>nicotinamide riboside</i> , <i>resveratrol</i> , vitamin

		<i>Stem Cell Extracellular Vesicles (ASC-EVs) Loaded with Natural Compounds</i>		C, retinol, dan arbutin ini bekerja sinergis untuk mengurangi stres oksidatif, menekan enzim perusak <i>collagen</i> , meningkatkan sintesis <i>collagen</i> , dan mengurangi pigmentasi.
8.	Yu, et al., 2025 ¹⁸	<i>MSCs-Derived Exosomes Injectable Hyaluronic Acid Hydrogel for Enhanced Chronic Wound Healing</i>	<i>In Vivo</i> <i>In Vitro</i>	Formulasi MSCs-Exo yang dimuat ke dalam <i>hydrogel</i> berbasis HA dengan dosis 200 µL yang disuntikkan secara subkutan mempercepat regenerasi jaringan yang lebih efektif dan fungsional dibandingkan dengan yang diinjeksi HA saja

Suatu penelitian melaporkan bahwa ADSC-EV mengurangi kerutan kulit pada tikus BALB/c betina dengan *collagen loss* akibat paparan UVB sekaligus mendorong proliferasi sel epidermis, mengurangi infiltrasi makrofag serta produksi ROS, sedangkan pada penelitian ini variabel terikat yang diamati adalah ekspresi gen COL1A1 dan TIMP pada tikus wistar.²³ Penelitian oleh Hu, *et al* melaporkan bahwa secara *in vivo*, pemberian AMSCs-Exo pada tikus BALB/c jantan model luka kulit dapat meningkatkan ekspresi *collagen* tipe I dan tipe III pada tahap awal penyembuhan luka kulit, sedangkan pada penelitian ini yang diteliti adalah pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.²⁰

Penelitian lain oleh Hu, *et al* pada tahun 2019 melaporkan bahwa secara *in vivo*, pemberian *Exosome derived from Human Dermal Fibroblast* (HDF-Exos) pada tikus *nude* model *photoaging* akibat paparan UVB melaporkan peningkatan ekspresi *procollagen* tipe I dan penurunan ekspresi

MMP-1 melalui penurunan regulasi *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) dan peningkatan regulasi *transforming growth factor beta* (TGF- β),²¹ sedangkan penelitian ini menggunakan tikus wistar model *collagen loss* untuk mengetahui pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1.

Penelitian oleh Chung, *et al* pada tahun 2001 melaporkan bahwa secara *in vivo* pada manusia, kadar protein MMP-1 dan ekspresi mRNA *procollagen* α 1(I) meningkat pada kulit yang menua akibat paparan UVB dibandingkan dengan kulit yang terlindungi dari sinar matahari, sedangkan penelitian ini menggunakan tikus wistar model *collagen loss* untuk mengetahui pengaruh kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1.¹⁹

Penelitian oleh Vo, *et al* pada tahun 2025 melaporkan bahwa secara *in vitro*, kombinasi *Adipose-Derived Stem Cell Extracellular Vesicles* ASC-EVs dan senyawa alami *nicotinamide roboside*, resveratrol, vitamin C, retinol, dan arbutin ini bekerja sinergis untuk mengurangi stres oksidatif, menekan enzim perusak *collagen*, dan meningkatkan sintesis *collagen*. Penelitian ini menggunakan kombinasi *exosome hypoxia* MSCs dan HA pada tikus wistar model *collagen loss* untuk mengetahui pengaruhnya terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1.²⁵

Penelitian oleh Zhu *et al* pada tahun 2024 melaporkan bahwa secara *in vitro*, kombinasi *collagen* oligopeptida terhidrolisis dan (Exo-UCMSCs) secara sinergis meningkatkan proliferasi dan migrasi fibroblas dengan

meningkatkan *collagen type I*, elastin, fibronectin, katalase, dan SOD1. Penelitian ini menggunakan kombinasi *exosome hypoxia* MSCs dan HA pada tikus wistar model *collagen loss* untuk mengetahui pengaruhnya terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1.²⁴

Penelitian oleh Wang *et al* pada tahun 2019 melaporkan bahwa secara *in vivo*, AMSCs-exo yang dimuat ke dalam hidrogel FHE berbasis polipeptida menstimulasi pembentukan jaringan granulasi, deposisi *collagen*, dan re-epitelisasi kulit pada tikus model luka kulit diabetes, sedangkan studi ini meneliti kombinasi *exosome hypoxia* MSCs dan HA pada tikus wistar model *collagen loss* untuk mengetahui pengaruhnya terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1.²² Yu *et al.* (2025) menyebutkan bahwa formulasi MSCs-Exo yang dimuat ke dalam *hydrogel* berbasis HA dengan dosis 200 μ L yang disuntikkan secara subkutan mempercepat regenerasi jaringan yang lebih efektif dan fungsional dibandingkan dengan yang diinjeksi HA saja, yang menjadi salah satu dasar dari dosis yang digunakan dalam penggunaan *exosome hypoxia* MSCs dan HA pada penelitian ini.¹⁸

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Collagen*

2.1.1. Definisi dan Tipe *Collagen*

Collagen adalah protein struktural yang paling melimpah di dalam tubuh manusia dan merupakan komponen utama dari matriks ekstraseluler di dermis kulit.^{16,26} Fungsinya adalah untuk memberikan kekuatan tarik (*tensile strength*), struktur, dan ketahanan pada jaringan, membentuk kerangka yang menopang sel-sel dan komponen ECM lainnya. *Collagen* menyusun sekitar 75% dari berat kering kulit, menjadikannya penentu utama integritas dan penampilan kulit yang sehat.¹⁶

Di dalam kulit manusia, terdapat beberapa tipe *collagen*, namun dua tipe yang paling dominan dan relevan dengan proses penuaan adalah *Collagen* Tipe I dan *Collagen* Tipe III. *Collagen* Tipe I merupakan yang paling melimpah, mencakup 80-90% dari total *collagen* kulit. Ia membentuk serat-serat tebal dan kuat yang bertanggung jawab atas kekuatan dan kekencangan kulit.^{16,26,27} *Collagen* tipe III, yang menyusun sekitar 8-12% dari total *collagen*, membentuk serat-serat retikuler yang lebih tipis dan lebih elastis, sering ditemukan bersamaan dengan *collagen* tipe I.¹⁶⁻¹⁸ Rasio antara *collagen* tipe I dan tipe III dapat menjadi penanda biologis yang canggih untuk kualitas kulit. Kulit muda dan sehat memiliki rasio

tipe I/III yang tinggi, sementara pada kulit yang menua atau dalam proses penyembuhan luka, rasio ini cenderung menurun, mengindikasikan pergeseran menuju matriks yang lebih rapuh dan mirip jaringan parut.^{16,26}

2.1.2. Sintesis dan Degradasi *Collagen*

Homeostasis *collagen* diatur oleh keseimbangan dinamis antara proses sintesis (produksi) dan degradasi (perombakan). Sintesis *collagen* adalah fungsi utama dari sel-sel fibroblas dermal. Proses ini diatur secara ketat oleh berbagai jalur pensinyalan, dengan jalur TGF- β /Smad menjadi salah satu regulator positif yang paling penting.^{16,26}

Di sisi lain, degradasi *collagen* dimediasi oleh sekelompok enzim yang disebut *Matrix Metalloproteinases* (MMPs). MMP-1 (juga dikenal sebagai *collagenase-1*) adalah enzim kunci yang menginisiasi perombakan *Collagen* Tipe I dan III dengan memotong molekul heliks tripelnya. Setelah pemotongan awal ini, fragmen-fragmen *collagen* menjadi lebih rentan terhadap degradasi lebih lanjut oleh MMP lain, seperti MMP-3 dan MMP-9.^{16,26}

Pada *photoaging*, keseimbangan ini secara drastis bergeser ke arah degradasi. Paparan radiasi UVB memicu produksi masif *Reactive Oxygen Species* (ROS) di dalam sel kulit. ROS ini mengaktifkan jalur pensinyalan intraseluler seperti MAPK dan faktor transkripsi seperti AP-1 dan NF- κ B.^{16,26} Aktivasi jalur-jalur ini

secara langsung meningkatkan transkripsi dan sekresi MMP oleh fibroblas dan keratinosit, yang menyebabkan perombakan *collagen* yang masif. Lebih buruk lagi, proses ini menciptakan lingkaran setan yang didorong oleh mekanobiologi. Matriks *collagen* yang utuh memberikan tegangan mekanis yang esensial bagi fibroblas, menjaga mereka tetap dalam bentuk yang teregang dan aktif secara metabolik. Ketika MMP memfragmentasi matriks ini, tegangan tersebut hilang, menyebabkan fibroblas "mengendur" dan kolaps.^{16,20} Kondisi yang tidak terstimulasi secara mekanis ini, pada gilirannya, memberi sinyal pada fibroblas untuk mengurangi sintesis *collagen* baru dan justru meningkatkan produksi MMP lebih banyak lagi, sehingga mempercepat penghancuran matriks.^{1,16}

2.1.3. Peran *Collagen* dalam Integritas Jaringan dan *Remodelling*

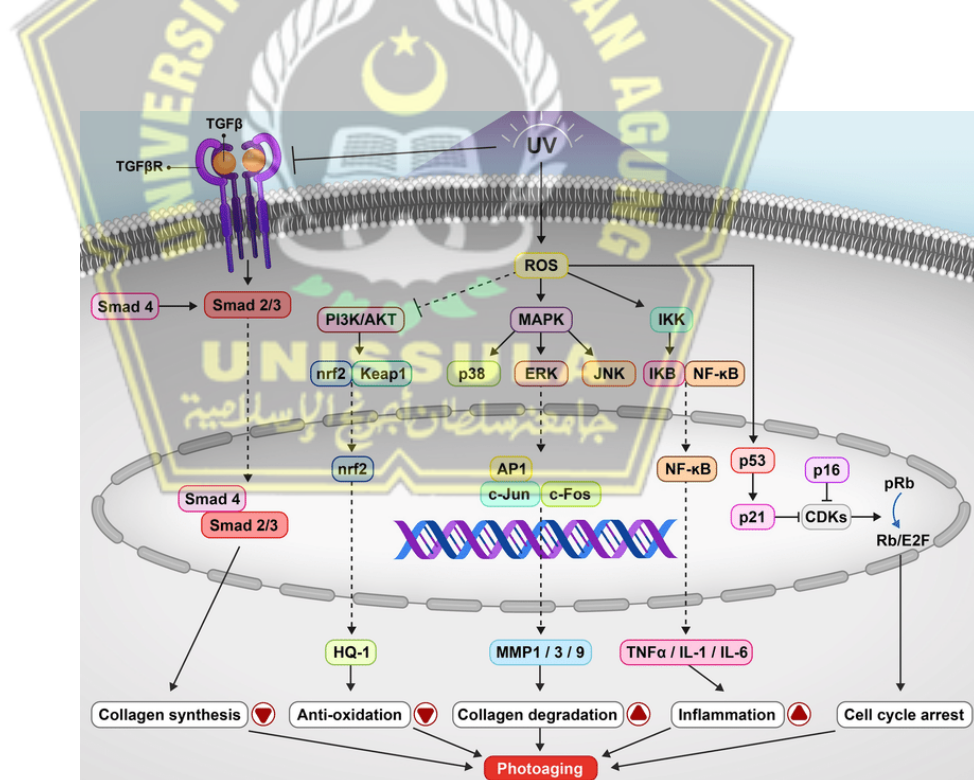
Integritas struktural, elastisitas, dan penampilan kulit yang muda sangat bergantung pada jaringan *collagen* yang padat, utuh, dan terorganisir dengan baik di dermis.^{1,16} Jaringan yang sehat dipertahankan melalui keseimbangan homeostatik yang cermat antara sintesis dan degradasi *collagen*.^{16,28} Pada *photoaging*, keseimbangan ini rusak parah, dengan laju degradasi yang jauh melampaui laju sintesis.^{16,26} Hal ini mengakibatkan hilangnya *collagen* fungsional secara netto, yang secara klinis bermanifestasi sebagai kerutan, kulit kendur, dan penurunan kualitas kulit secara keseluruhan.

Fragmen-fragmen *collagen* yang terdegradasi bukan hanya sisa-sisa yang tidak aktif; mereka adalah sinyal aktif dari kerusakan jaringan. Kemajuan dalam biologi molekuler telah menghasilkan alat diagnostik canggih, seperti *Collagen Hybridizing Peptides* (CHPs), yang dirancang untuk secara spesifik mengikat untaian *collagen* yang telah terdenaturasi atau terdegradasi ini.²⁸ Pendekatan ini memungkinkan deteksi dan kuantifikasi langsung dari kerusakan matriks, bukan hanya mengukur hilangnya *collagen* utuh. Penggunaan teknik semacam ini dapat memberikan ukuran yang lebih spesifik tentang efektivitas suatu terapi dalam membersihkan matriks yang rusak dan mempromosikan perbaikan jaringan, sebuah titik akhir yang lebih canggih daripada sekadar mengukur kandungan *collagen* total.

2.1.4. Peran *Collagen* dan Kehilangannya (*Collagen Loss*) dalam *Photoaging*

Integritas struktural dan kekencangan kulit sangat bergantung pada jaringan padat serat *collagen* di dermis. Mekanisme *photoaging* akibat paparan UVB disajikan pada Gambar 2.1. Paparan sinar ultraviolet (UVA dan UVB), panas inframerah, serta faktor lingkungan seperti polusi udara dan asap rokok meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) di kulit. Akumulasi ROS menginduksi stres oksidatif menyebabkan oksidasi DNA, protein, dan lipid, serta memperpendek telomer. Aktivasi jalur

Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) oleh ROS memicu aktivasi faktor transkripsi AP-1 dan NF- κ B yang meningkatkan produksi sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6, TNF- α) dan *matrix metalloproteinases* (MMPs). Peningkatan MMPs mempercepat degradasi *collagen* dan serat elastin, sedangkan AP-1 menekan sintesis *collagen* baru. Proses ini menyebabkan hilangnya integritas dermis, pembentukan fibril *collagen* yang terfragmentasi, serta detasemen fibroblas dari jaringan *collagen*, yang secara klinis tampak sebagai kerutan (*wrinkling*) dan kulit mengendur (*sagging*).^{1,29}



Gambar 2.1. Patogenesis Photoaging²⁹

2.2. Gen *Collagen* Tipe I Alfa 1 (COL1A1)

2.2.1. Struktur COL1A1

Collagen tipe I adalah molekul heterotrimerik yang terdiri dari dua rantai $\alpha 1(I)$ dan satu rantai $\alpha 2(I)$, masing-masing dengan panjang lebih dari 1000 asam amino. Gen *collagen* tipe I alfa 1 (COL1A1) dan *collagen* tipe I alfa 2 (COL1A2) mengkode propeptida dengan ujung amino dan karboksil, yang dikenal sebagai rantai pro- $\alpha 1(I)$ dan rantai pro- $\alpha 2(I)$. Ketika rantai pro- α telah dirakit menjadi domain tiga heliks yang khas, mereka disekresikan ke luar sel, tempat propeptida dimodifikasi oleh protease spesifik lokasi untuk menghasilkan molekul *collagen* lengkap.³⁰ Pada tahun 1984, deskripsi paling awal dari COL1A1 mengonfirmasi bahwa gen tersebut dikode oleh kromosom 17. Gen COL1A1 memiliki panjang 18 kb dan terdiri dari 52 ekson. Ini mentranskripsi dua RNA dengan urutan non-coding 3'-end yang berbeda masing-masing 5,8 kb dan 4,8 kb, menghasilkan protein 140-kDa. Protein COL1A1 terdiri dari 1464 asam amino. Domain *triple helix* pusat protein COL1A1 terdiri dari 338 pengulangan triplet Gly-XY, di mana X biasanya prolin dan Y biasanya hidroksiprolin. Gen COL1A2 memiliki panjang 36,67 kb dan terdiri dari 52 ekson.³¹

Gen COL1A1 adalah sebuah gen yang menyiapkan instruksi pembuatan komponen *collagen*. Protein *collagen* inilah yang memperkuat dan mendukung beberapa jaringan penunjang dalam

tubuh seperti kartilago, tulang, tendo, kulit, dan sklera (mata). Gen COL1A1 memproduksi sebuah komponen tipe 1 *collagen* yang dikenal sebagai proalpha1 (I) chain. Pro-alpha1 ini bergabung dengan pro-alpha2 yang diproduksi oleh Gen 31 COL1A2 untuk membuat molekul prokollagen tipe 1.³²

2.2.2. Regulasi Sintesis dan Degradasi COL1A1

Sintesis *COL1A1* di fibroblas dikendalikan oleh rangkaian sinyal yang berpuncak pada aktivasi transkripsi. Jalur *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) merupakan regulator sentral yang melalui aktivasi reseptor serine/threonine menginisiasi fosforilasi Smad2/3, kompleks Smad2/3–Smad4 kemudian masuk ke inti sel untuk mengaktivasi gen target termasuk COL1A1. Selain Smad, kofaktor transkripsi (mis. p300/CBP), Sp1, dan regulator epigenetik (mis. metilasi DNA, perubahan histon) memodulasi tingkat ekspresi COL1A1. Paparan faktor yang menghambat TGF-β (mis. penurunan fungsi reseptor atau interferensi jalur) berujung pada penurunan ekspresi COL1A1 dan sintesis *collagen*.^{33–35}

Selain penurunan sintesis, kehilangan *collagen* dipercepat oleh degradasi proteolitik yang dimediasi *matrix metalloproteinases* (MMPs), khususnya MMP-1 (*collagenase-1*) yang memutus heliks *collagen* tipe I. Paparan sinar ultraviolet (UV) kulit mengaktifkan reseptor membran dan jalur MAPK (ERK, JNK, p38), yang pada gilirannya mengaktifkan faktor transkripsi AP-1 (c-Fos/c-Jun). AP-1

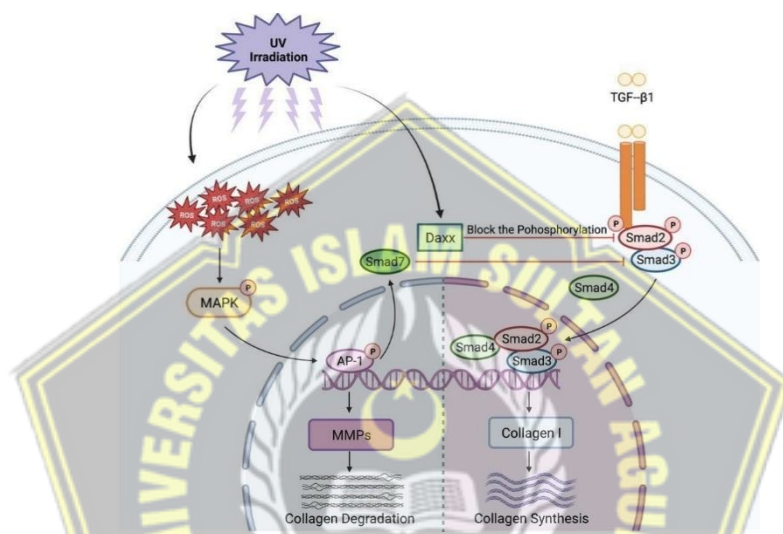
meningkatkan transkripsi berbagai MMP sehingga laju pemecahan *collagen* meningkat drastis, yang merupakan fenomena inti *photoaging*. Selain itu, aktivasi AP-1 dapat menekan jalur pembentukan *collagen* (TGF- β /Smad), sehingga kulit mengalami kombinasi dua mekanisme: berkurangnya sintesis dan meningkatnya degradasi *collagen*.³⁶⁻³⁸

2.2.3. Aktivasi dan Mekanisme Seluler COL1A1 pada Kulit yang Terpapar UVB dan Penurunan *Collagen*

Paparan radiasi UVB (280–320 nm) memicu stres oksidatif yang kuat di sel-sel kulit, terutama fibroblas dermal yang berperan penting dalam sintesis *collagen*. Ketika kulit terpapar UVB, terjadi peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan kerusakan DNA dan memicu aktivasi jalur transduksi sinyal seperti MAPK (ERK, JNK, p38). Aktivasi jalur ini memicu pembentukan kompleks transkripsi AP-1 (c-Fos/c-Jun) yang berperan penting dalam penghambatan ekspresi gen COL1A1. Selain itu, AP-1 juga menginduksi ekspresi MMP-1 (*Matrix Metalloproteinase-1*), enzim yang memecah *collagen* tipe I dan III, sehingga mempercepat degradasi struktur dermis.^{6,39}

UVB mengganggu jalur pensinyalan TGF- β /Smad, yang secara normal berfungsi mengaktifkan sintesis *collagen*, seperti dijelaskan dalam Gambar 2.2. Dalam kondisi normal, TGF- β 1 mengikat reseptornya di permukaan fibroblas dan mengaktifkan Smad2/3,

yang kemudian menstimulasi transkripsi gen COL1A1 di inti sel. Namun, paparan UVB menurunkan kadar TGF- β 1 dan menghambat fosforilasi Smad2/3, sehingga sinyal positif untuk sintesis *collagen* berkurang drastis. Akibatnya, ekspresi COL1A1 menurun dan produksi *collagen* baru menjadi sangat terbatas.⁴⁰⁻⁴²



Gambar 2.2. Jalur Pensinyalan TGF- β /Smad akibat Paparan UVB⁴³

Selain dua jalur utama tersebut, paparan UVB berulang juga meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-6, TNF- α , dan IL-1 β , yang memperburuk keadaan dengan menekan aktivitas fibroblas sehingga menurunkan kapasitas sintesis matriks ekstraseluler (*extracellular matrix/ECM*) termasuk COL1A1 dan memperkuat ekspresi MMP. Kombinasi stres oksidatif, penurunan TGF- β , dan peningkatan sitokin menyebabkan ketidakseimbangan antara sintesis dan degradasi *collagen*, yang menjadi penyebab utama proses *collagen loss*. Pada tingkat jaringan, hal ini tampak sebagai hilangnya elastisitas kulit, munculnya kerutan, dan penipisan

dermis.^{44,45} Secara keseluruhan, UVB menimbulkan efek ganda pada jaringan kulit: menghambat sintesis *collagen* melalui penurunan ekspresi COL1A1 dan meningkatkan degradasi *collagen* melalui induksi MMP-1. Dua proses ini terjadi secara sinergis dan berkelanjutan, menyebabkan penurunan densitas *collagen* dermal. Oleh karena itu, penelitian yang memfokuskan pada pemulihan ekspresi COL1A1, penekanan aktivitas MMP, dan pemulihan fungsi fibroblas merupakan pendekatan rasional untuk menangani penuaan kulit dan kehilangan *collagen*.

2.3. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1* (TIMP-1)

2.3.1. Definisi dan Fungsi TIMP-1

Inhibitor jaringan metalloproteinase (*tissue inhibitor of metalloproteinase*/TIMP) adalah inhibitor endogen dari keluarga protease matriks (*matrix metalloproteinases*/MMPs) yang berfungsi menahan aktivitas MMP yang memecah komponen ECM seperti *collagen*, elastin, dan proteoglikan. TIMP mengikat dan menginhibisi banyak MMP (kecuali sebagian *membrane type*-MMP) melalui domain N-terminalnya yang memasuki situs aktif MMP.³

Selain fungsi inhibisi MMP, TIMP juga memiliki fungsi non-protease, misalnya pro-survival (anti-apoptosis), proliferasi sel fibroblas/keratinosit, dan kemungkinan fungsi sinyal seluler.³ TIMP dihasilkan oleh berbagai jenis sel (fibroblas, keratinosit, sel dermal lainnya) dan berperan menjaga keseimbangan antara degradasi dan

sintesis ECM. Beberapa jurnal menyebutkan TIMP sebagai “*natural protector of the skin extracellular matrix*”.^{3,46} Dalam kulit, TIMP diproduksi oleh fibroblas dermal dan juga keratinosit epidermal, dan ia berperan menjaga keseimbangan antara sintesis dan degradasi ECM yang meliputi *collagen*, elastin, dan proteoglikan.⁴⁷

Ketika keseimbangan antara MMPs dan TIMP terganggu, misalnya MMPs meningkat atau TIMP menurun, terjadi peningkatan degradasi *collagen* dan penurunan kualitas ECM yang berkontribusi pada kerutan, elastisitas kulit turun, dan penuaan kulit (*photoaging*).⁴⁸

Manusia memiliki empat isoform TIMP yang diketahui saat ini, yaitu TIMP-1, -2, -3 dan -4. Keempat TIMP menghambat MMP, tetapi dengan afinitas yang bervariasi untuk pasangan inhibitor-protease yang berbeda.⁷ Di antara 4 isoform tersebut, TIMP-1 mengalami laju perubahan evolusi terendah dan paling dekat dengan bentuk leluhurnya secara berurutan. Duplikasi gen untuk TIMP dua domain leluhur, menghasilkan dua gen, satu merupakan leluhur kelompok TIMP-1 modern dan yang lainnya merupakan leluhur tiga galur TIMP yang tersisa. Duplikasi lebih lanjut menghasilkan galur gen TIMP-3 dan leluhur kelompok TIMP-2/TIMP-4.⁴⁹ TIMP-1 menghambat semua MMP, kecuali beberapa MT-MMP dan disintegrin dengan domain metalloproteinase (*a disintegrin with a metalloproteinase/ADAM*)-10.⁵⁰ Ekspresinya menurun seiring

penuaan fibroblas, baik *ex vivo* maupun *in vivo*, sehingga berkontribusi terhadap peningkatan MMP dalam dermis.

TIMP-1 menghambat sebagian besar MMP, kecuali subfamili MMP tipe membran, dengan K_i dalam rentang subnanomolar, tetapi juga berinteraksi dengan domain seperti hemopexin dari pro MMP-9. Selain itu, ia menunjukkan aktivitas seperti keratinosit dan faktor pertumbuhan fibroblas dan telah dideskripsikan sebagai factor kelangsungan hidup sel.⁵¹

Gen TIMP-1 manusia dipetakan ke kromosom X pada Xp11.1–11.4 dan inhibitorynya dikodekan sebagai mRNA 0,9 kb . Gen ini terdiri dari satu rantai polipeptida yang mengandung 184 asam amino, di antaranya 12 residu sistein yang membentuk enam ikatan disulfida yang membagi molekul menjadi tiga struktur seperti simpul. Molekul TIMP-1 sangat terlikosilasi dan akibatnya massa molekulnya berkisar antara 28,4 hingga 34 kDa.⁵⁰ TIMP-1 juga pertama kali diidentifikasi sebagai faktor aktivitas potensiasi eritroid (EPA) dan sejak itu, baik TIMP-1 maupun TIMP-2 telah dideskripsikan menunjukkan aktivitas pendorong pertumbuhan untuk berbagai macam sel, sementara TIMP-3 dapat mendorong apoptosis secara *in vitro* dan *in vivo*.⁵¹

Dasar aksi penghambatan TIMP didasarkan pada struktur kristalografi sinar-X kompleks TIMP-1 manusia dengan domain katalitik MMP-3 manusia. Struktur kompleks bentuk rekombinan

TIMP-1 manusia dan domain katalitik MMP-3 menunjukkan bahwa tepi molekul TIMP-1 yang berbentuk baji menyisip ke dalam situs katalitik dan alur pengikatan substrat MMP-3 (Gambar 2.3).



Gambar 2.3. Model Kristalografi kompleks MMP–TIMP⁴⁹

2.3.2. Aktivasi dan Mekanisme Seluler TIMP-1 pada Kulit yang Terpapar UVB dan Penurunan *Collagen*

Collagen tipe I dan III membentuk kerangka struktural matriks ekstraseluler dermis, menjaga kekuatan tarik kulit dan integritas mekanik jaringan. Keseimbangan antara degradasi *collagen* oleh enzim matrix metalloproteinases (MMPs) dan proteksi melalui inhibitor endogen seperti TIMP-1 sangat menentukan stabilitas *collagen*.⁵² TIMP-1 adalah inhibitor alami dari banyak MMP, termasuk MMP-1, MMP-3 dan MMP-9, yang berperan dalam pemecahan heliks *collagen*.³⁵

Paparan UVB menyebabkan sejumlah respons seluler dalam

kulit, termasuk produksi reaktif oksigen spesies (ROS), aktivasi jalur MAPK (ERK, JNK, p38). Aktivasi jalur ini menyebabkan transkripsi berbagai faktor, termasuk AP-1 (*Activator Protein-1*) dan NF- κ B, yang merupakan pengendali utama ekspresi gen-gen degradasi matriks.^{40,41}

Aktivasi AP-1 meningkatkan transkripsi MMP-1, MMP-3, MMP-9, enzim-enzim utama yang memecah *collagen* fibriler tipe I dan III di dermis. Secara normal, ekspresi MMP dikendalikan oleh inhibitor endogen, yaitu TIMP-1. Namun, paparan UVB kronis menurunkan ekspresi TIMP-1 pada fibroblas kulit, baik melalui stres oksidatif maupun melalui regulasi epigenetik (metilasi promotor TIMP-1).^{3,53} Akibatnya, rasio MMP/TIMP-1 meningkat tajam, menyebabkan dominasi aktivitas proteolitik pada ECM. Ketidakseimbangan ini menimbulkan degradasi *collagen* yang lebih cepat daripada sintesisnya, mempercepat penipisan dermis dan menurunkan elastisitas kulit. Dalam konteks ini, TIMP-1 memainkan dua fungsi utama, yaitu menghambat aktivitas MMPs sehingga menurunkan laju degradasi *collagen* dan memodulasi sinyal seluler seperti inflamasi dan senesensi fibroblas yang turut mempercepat kehilangan *collagen*.

Sebuah penelitian xenograft manusia menemukan bahwa ekspresi TIMP-1 menurun pada kulit yang mengalami penuaan intrinsik dan ekstrinsik, dan bahwa over-ekspresi TIMP-1

menghambat kerusakan ECM serta penurunan elastisitas kulit akibat UVB, sedangkan netralisasi TIMP-1 mempercepat kerusakan.³ Sebuah studi intervensi secara *in vivo* menunjukkan bahwa agen yang meningkatkan TIMP-1 juga mampu menurunkan ekspresi MMPs, meningkatkan *procollagen* dan memperbaiki indikator kerusakan *collagen* akibat UVB.⁵³ Suatu studi menggunakan ekstrak tanaman *Schizonepeta tenuifolia* pada paparan UVB juga melaporkan bahwa selain menurunkan MMP1/3/9, terdapat peningkatan ekspresi TIMP-1 sekaligus. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme proteksi *photoaging* dapat melalui peningkatan TIMP-1.⁴⁷

Regulasi ekspresi TIMP-1 menjadi salah satu titik penting dalam mekanisme seluler kehilangan *collagen* akibat UVB. Bila TIMP-1 tidak memadai, maka aktivitas MMPs akan mendominasi, sehingga *collagen* di dermis mengalami degradasi lebih cepat yang akan mengakibatkan penipisan dermis, kerutan, dan elastisitas kulit menurun.

2.4. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)

2.4.1. Definisi MSCs

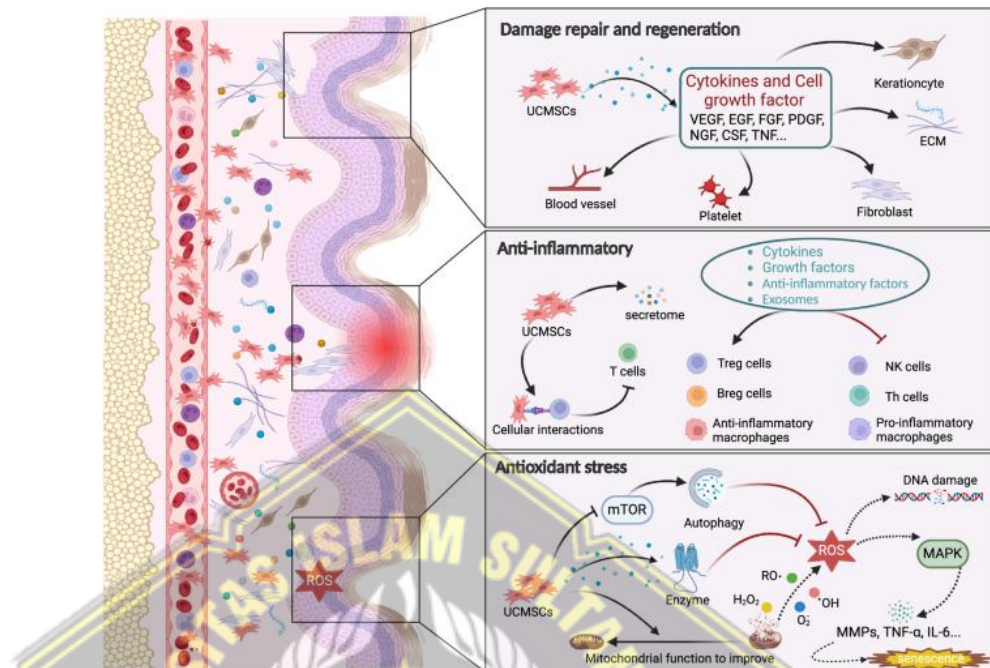
Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adiposit, dan neurosit. MSCs dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adiposa, folikel rambut, hingga

Wharton Jelly dari tali pusat.⁵⁴ 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.⁵⁵

2.4.2. 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 *immunoregulator* 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 mengekspresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi.^{56,57} Peran MSCs dalam proses regenerasi, perbaikan kerusakan jaringan, anti

inflamasi, dan antiosidan diilustrasikan dalam Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Peran MSCs pada Proses Regenerasi di Kulit karena Paparan UVB⁵⁸

2.4.3. Konsep *Small Molecule Growth Factor* MSCs

Terminologi fungsional MSCs didasarkan pada kemampuannya dalam menskresi berbagai *soluble molecule* secara parakrin. Konsep parakrin adalah komunikasi MSCs dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepaskan oleh MSCs. Secara spesifik, konsep *small molecule growth factor* MSCs didasarkan pada hal-hal berikut⁵⁹:

1. Kompleksitas teknik isolasi MSCs

Teknik dan metode dalam mengisolasi MSCs membutuhkan teknik yang kompleks disamping kerja aseptis serta waktu kultur (selama beberapa minggu) untuk mendapatkan

turunan MSCs 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 MSCs yang singkat

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

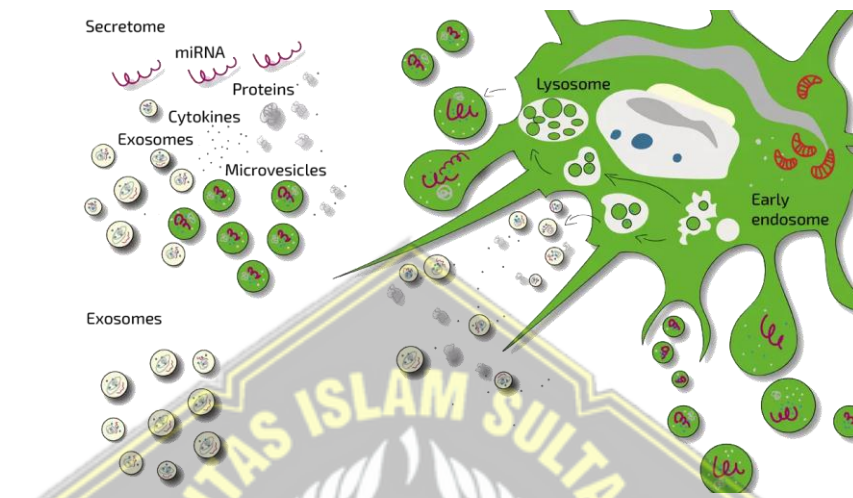
3. Konsep molekul parakrin MSCs dalam regenerasi

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

2.4.4. Induksi *Small Molecule* dan *Exosome* MSCs

Peranan *small molecule* dan *exosome* MSCs ini, sehingga memunculkan berbagai upaya dalam menghasilkan *small molecule* dan *exosome* secara *in-vitro*. Secara spesifik induksi *small molecule growth factor* MSCs dapat dibagi menjadi 2, yaitu menginduksi MSCs dengan stimulasi molekul pro-inflamasi, secara teoritis, MSCs yang diaktivasi sebelumnya oleh TNF- α dapat melepas berbagai molekul anti-inflamasi. MSCs yang diinkubasi dalam keadaan hipoksia akan melepaskan berbagai molekul pro-regenerasi. Hal ini memunculkan teori *hypoxic preactivated MSCs-induced soluble molecule* yaitu berbagai molekul terlarut dalam medium dilepas MSCs 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. Berbagai miRNA yang terkandung dalam *exosome hypoxia* MSCs juga mampu berperan

dalam inhibisi stres oksidatif, seperti miR21, miR-22-3p dan miR-215-5p.⁶⁰



Gambar 2.5. Komponen yang dikeluarkan oleh MSCs⁶¹

2.5. Hyaluronic Acid (HA)

2.5.1. Definisi HA

Asam hialuronat/*hyaluronic acid* (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 *collagen* 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

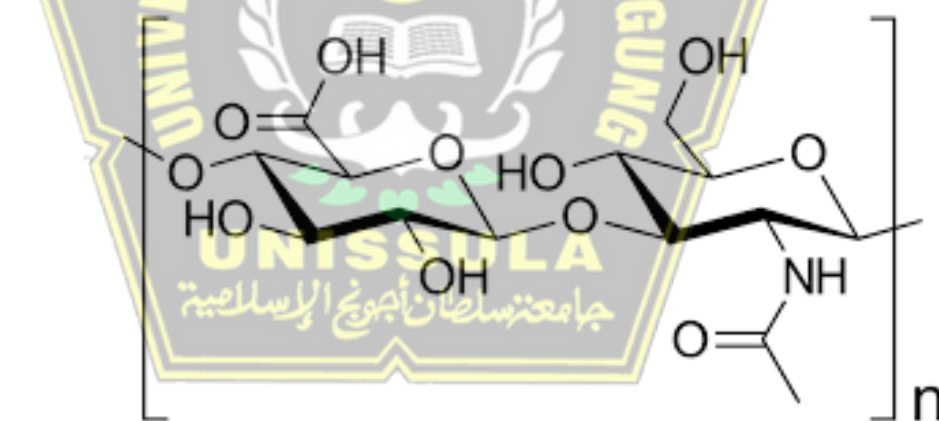
elastisitas kulit.⁶²

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. 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.⁶³

Asam hialuronat membentuk ikatan hidrogen, yang, di satu sisi, dapat menyeimbangkan makromolekul dalam larutan, tetapi, di sisi lain, menimbulkan kekakuan dalam sistem polimer, yang, akhirnya, menentukan sifat-sifat larutan asam hialuronat. Gambar 2.6 menunjukkan ikatan hidrogen potensial yang dapat terbentuk baik di dalam satu makromolekul, dan antara molekul-molekul yang berdampingan. Asam hialuronat dan garamnya, dengan ion amonium, magnesium, dan logam alkali, memiliki kelarutan yang baik dalam air dan memiliki tingkat viskositas yang tinggi bahkan pada konsentrasi polimer rendah. Selain itu, asam hialuronat dalam larutan dapat mengatur struktur seluler tiga dimensi dengan dimensi yang sangat besar pada konsentrasi kurang dari 1 $\mu\text{g/mL}$.

Sebaliknya, biopolimer dapat mengatur pseudo-gel ketika konsentrasi sama dengan atau di atas 1,0 wt.%. Namun, asam hialuronat dengan berat molekul tinggi sama dengan 5,0 MDa pada konsentrasi lebih besar dari 0,1 mg/mL membentuk jaringan polimer yang rapat, tetapi larutan asam hialuronat tidak memiliki integritas mekanis yang berkepanjangan. Garam asam hialuronat dengan kation yang memiliki dua atau lebih nomor valensi memiliki ketidaklarutan yang substansial dalam air. Selain itu, jika ion-ion tersebut dimasukkan ke dalam larutan asam hialuronat, ikatan silang antar molekul akan terbentuk, sehingga menghasilkan pembentukan gel dengan kandungan air yang tinggi.⁶⁴



Gambar 2.6. Struktur Kimia HA⁶⁴

HA dapat mengikat protein spesifik, seperti CD44, reseptor untuk motilitas yang dimediasi hialuronat (RHAMM), molekul adhesi antar sel 1 (ICAM-1), dan reseptor hialuronan endotel pembuluh limfatik 1 (LYVE1) untuk mengerjakan berbagai fungsi. Di antara mereka, CD44 adalah reseptor permukaan sel yang paling

banyak didistribusikan. HA mengikat reseptor CD44 pada permukaan keratinosit untuk mengaktifkan jalur pensinyalan intraseluler dan mengatur diferensiasi dan motilitas sel. CD44 juga berinteraksi dengan reseptor lain pada membran sel untuk memodulasi perilaku sel melalui berbagai faktor pertumbuhan, seperti MMP dan reseptor faktor pertumbuhan transformasi- β (TGF β R). Reseptor penting lainnya untuk HA adalah RHAMM, yang memiliki beberapa isoform dan terdapat pada berbagai jenis sel. Pengikatan HA pada RHAMM memediasi migrasi sel, adhesi, dan disolusi selama proses inflamasi.⁶⁵

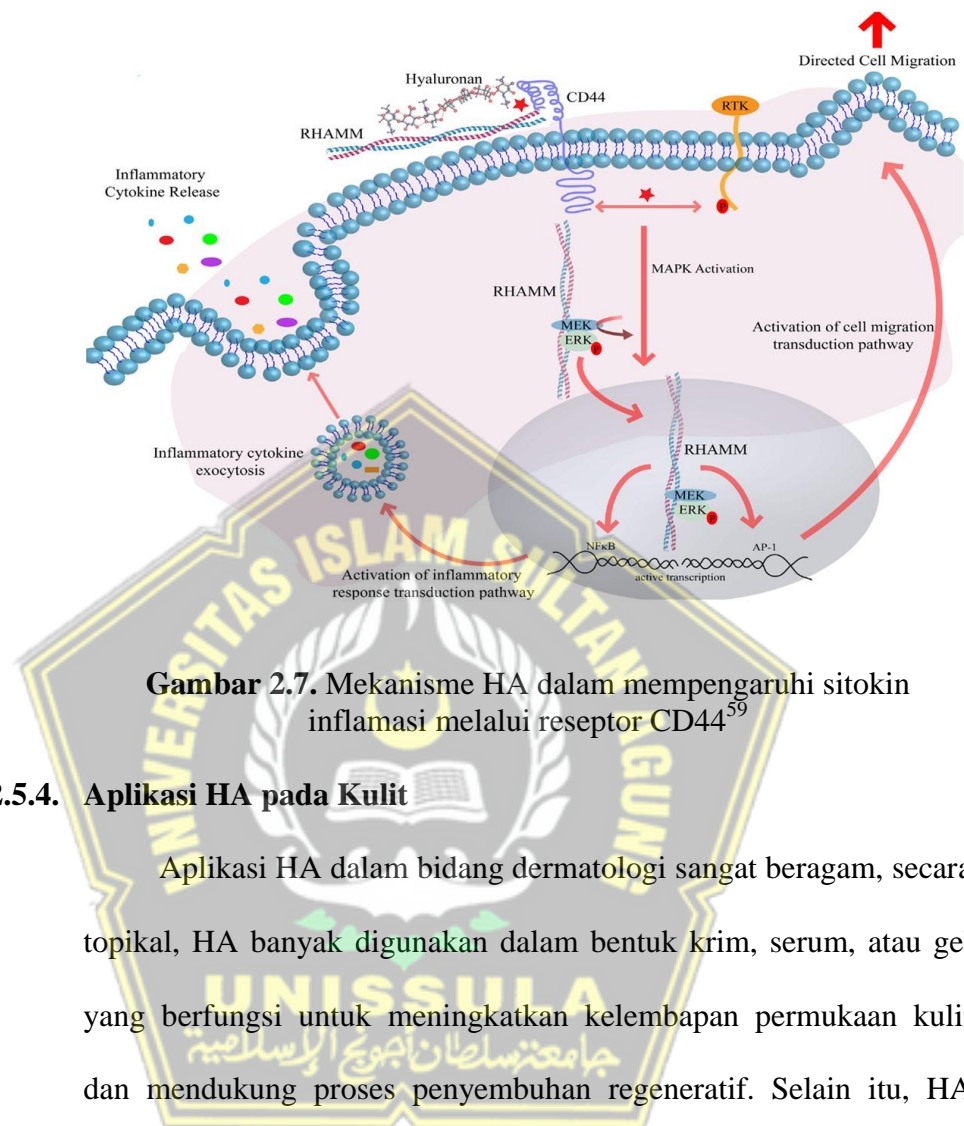
HA ditemukan dalam ECM dan matriks periseluler. Molekul HA mengandung sejumlah besar gugus karboksil dan hidroksil, yang dapat menahan sekitar 1000 kali berat airnya, membuatnya sangat hidrofilik. Oleh karena itu, HA mampu menghidrasi ECM untuk memodulasi homeostasis jaringan. Sementara itu, HA membentuk cangkang seluler di sekitar sel dan bertindak sebagai molekul sinyal antarsel untuk mengatur proliferasi dan migrasi sel, dan juga hadir di dalam sel, di mana ia berpartisipasi dalam mengatur proses inflamasi. Selain sifat-sifat yang disebutkan di atas, HA dicirikan oleh sifatnya yang non-imunogenik, tidak beracun, dan tidak inflamasi, sehingga menjadikannya sebagai bahan yang ideal untuk aplikasi medis. HA mampu menjaga homeostasis organisme dan mengatur fungsi biologis, termasuk imunomodulasi, penyembuhan

luka, regenerasi jaringan, antiproliferasi, antikanker, dan kosmetik kulit.⁶⁵

2.5.3. Mekanisme Molekuler HA dalam Menginduksi Produksi Collagen

Asam hialuronat meningkatkan *collagen* kulit melalui beberapa mekanisme molekuler yang saling terkait. HA berperan dalam hidrasi dan viskoelastisitas 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 *collagen* tipe I dan III yang penting untuk kesehatan kulit. HA juga membantu menstabilkan matriks ekstraseluler dengan menata ulang matriks granulasi sehingga serat *collagen* baru dapat tersusun dengan lebih baik dan terorganisir. HA mengurangi degradasi *collagen* dengan menurunkan aktivitas enzim *matrix metalloproteinase* (MMP), yang biasanya meningkat akibat stres oksidatif, seperti paparan sinar UVB, sehingga membatasi kerusakan *collagen*. 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 *collagen* lebih

lanjut, sebagaimana diilustrasikan oleh Gambar 2.7.^{62,63}



Gambar 2.7. Mekanisme HA dalam mempengaruhi sitokin inflamasi melalui reseptor CD44⁵⁹

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 *collagen* kulit. Pada kasus luka, HA dimanfaatkan dalam produk dressing atau inovasi lain untuk mempercepat penyembuhan dan merangsang regenerasi *collagen* di area yang terluka. Produk topikal biasanya mengandung HA dengan konsentrasi antara 0,2% hingga 2%,⁶³ 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.⁶⁶



BAB III

KERANGKA TEORI

3.1. Kerangka Teori

Paparan *ultraviolet* (UV) menyebabkan akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan dan aktivasi jalur pensinyalan molekuler di kulit yang bertujuan untuk mencegah kerusakan akibat sinar UV. Jalur pensinyalan *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) dan *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β)/Smad merupakan kaskade molekuler utama yang diinisiasi oleh sinar UV yang terlibat dalam proses penuaan dini. Aktivasi berlebih jaringan molekuler ini oleh paparan UV yang intensif atau berkepanjangan mengakibatkan penurunan sintesis *collagen*, degradasi matriks ekstraseluler (ECM), kerusakan DNA, disfungsi mitokondria, peradangan kulit, penuaan dini, gangguan proliferasi, migrasi, dan regenerasi sel, serta peningkatan kematian dan apoptosis sel.⁶⁷

Paparan UV memicu stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan kadar ROS. ROS mengaktifkan serangkaian kaskade pensinyalan MAPK, yang terdiri dari tiga sub-jalur utama, *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), dan p38. Aktivasi jalur ini, khususnya JNK dan p38, mengarah pada fosforilasi dan aktivasi faktor transkripsi yang disebut *Activator Protein-1* (AP-1). AP-1 yang teraktivasi, yang terdiri dari protein c-Fos dan c-Jun, kemudian bergerak ke dalam nukleus dan mendorong ekspresi gen untuk enzim perusak matriks seperti *matrix metalloproteinase-I* (MMP-1). MMP-1 secara spesifik menargetkan

dan mendegradasi *collagen* tipe I, komponen utama yang memberikan kekuatan dan struktur pada kulit, yang merupakan ciri khas kerusakan akibat sinar UV.¹ Selain itu, aktivasi sinyal AP-1 pada kulit menginduksi respons inflamasi melalui peningkatan ekspresi protein inflamasi seperti siklooksigenase-2 (COX-2) dan *interleukin* (IL)-6.³⁸

Paparan UV secara bersamaan mengganggu jalur pensinyalan TGF- β yang normalnya bertanggung jawab untuk sintesis *collagen* melalui mekanisme yang berbeda dengan jalur MAPK yang meningkatkan degradasi *collagen*. Sinyal TGF- β mengaktifkan Smad untuk menstimulasi proliferasi fibroblast pada dermis untuk meningkatkan sintesis *collagen*, sedangkan TGF- β meningkatkan TIMP-1 dan menurunkan ekspresi enzim yang mendegradasi protein matriks ekstraseluler seperti MMP-1, MMP-3, MMP-10, dan MMP-11. Namun, paparan UV menghambat jalur ini dengan menghasilkan ROS yang mengurangi ekspresi reseptor TGF- β tipe II dan mengaktifkan Smad7 yang bersifat antagonis. Akibatnya, jalur pensinyalan TGF- β /Smad, yang mengontrol COL1A1 untuk sintesis *procollagen* tipe I, menjadi terhambat. Sinergi antara aktivasi jalur MAPK (meningkatkan degradasi *collagen*) dan penghambatan jalur Smad (menurunkan sintesis *collagen*) menyebabkan keseimbangan *collagen* bergeser secara signifikan, mengakibatkan kehilangan *collagen* dan pembentukan kerutan yang terlihat pada *photoaging*.^{2,68}

Aktivasi *Nuclear Factor*- κ B (NF- κ B) melalui jalur *I κ B kinase* (IKK) menjadi komponen penting untuk bertranslokasi ke nukleus. Aktivasi

simultan AP-1 dan NF- κ B menciptakan lingkungan transkripsi yang sangat kondusif untuk produksi mediator inflamasi.⁶⁹ Kedua faktor transkripsi ini menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi secara masif, termasuk *interleukin-1* (IL-1) yang berfungsi sebagai *amplifier* 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 pleiotropik dalam menginduksi apoptosis keratinosit rusak dan mengamplifikasi aktivasi NF- κ B secara autokrin.^{70,71} Produksi sitokin proinflamasi ini kemudian menginduksi ekspresi enzim proteolitik utama yang bertanggung jawab atas degradasi *collagen*. *Matrix metalloproteinase-9* (MMP-9), yang memiliki *binding sites* untuk AP-1 dan NF- κ B, terekspresi secara masif dan disekresikan ke ruang ekstraselular.^{71,72}

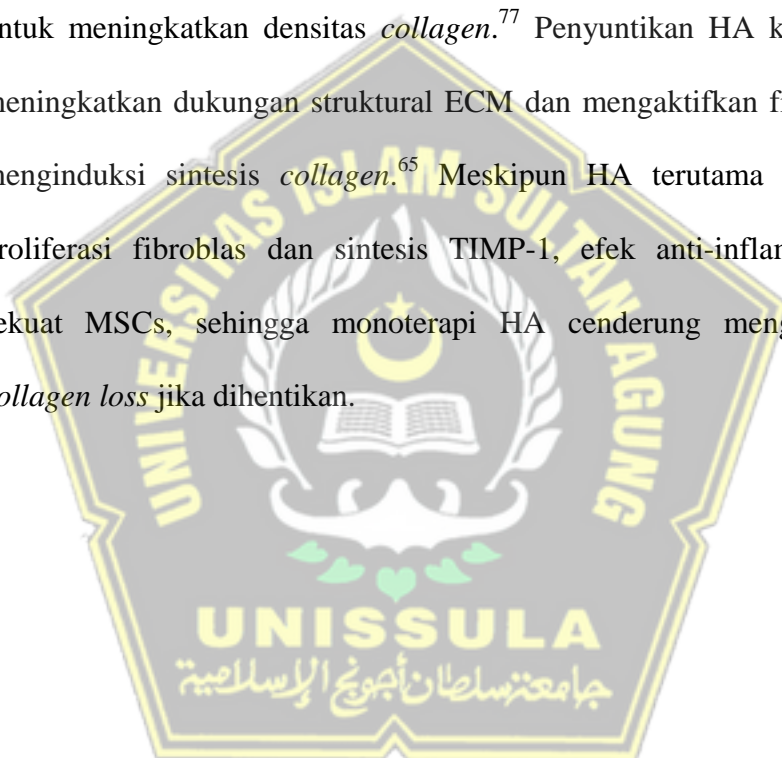
Exosome yang dihasilkan oleh *mesenchymal stem cells* (MSCs) yang dikondisikan dalam kondisi *hypoxia* menunjukkan potensi dalam mengatasi *collagen loss* akibat UVB.¹⁴ TGF- β yang mengaktivasi jalur Smad2/3 untuk menginduksi transkripsi *collagen* tipe I dan III dan *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs). *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) mengandung TGF- β 1, Smad2/3 mRNA, atau miRNA yang mengatur ekspresi gen target jalur ini. *Exosome* dengan TGF- β 1 berikatan dengan *Transforming Growth Factor-beta Receptor Type II* (TGF- β RII) pada sel target dan merekrut TGF- β RI yang memfosforilasi Smad2/3. Smad2/3 kemudian berpindah ke nukleus dan mengikat promotor COL1A1 dan TIMP-1 dan menginduksi transkripsi. Akibatnya, terjadi peningkatan

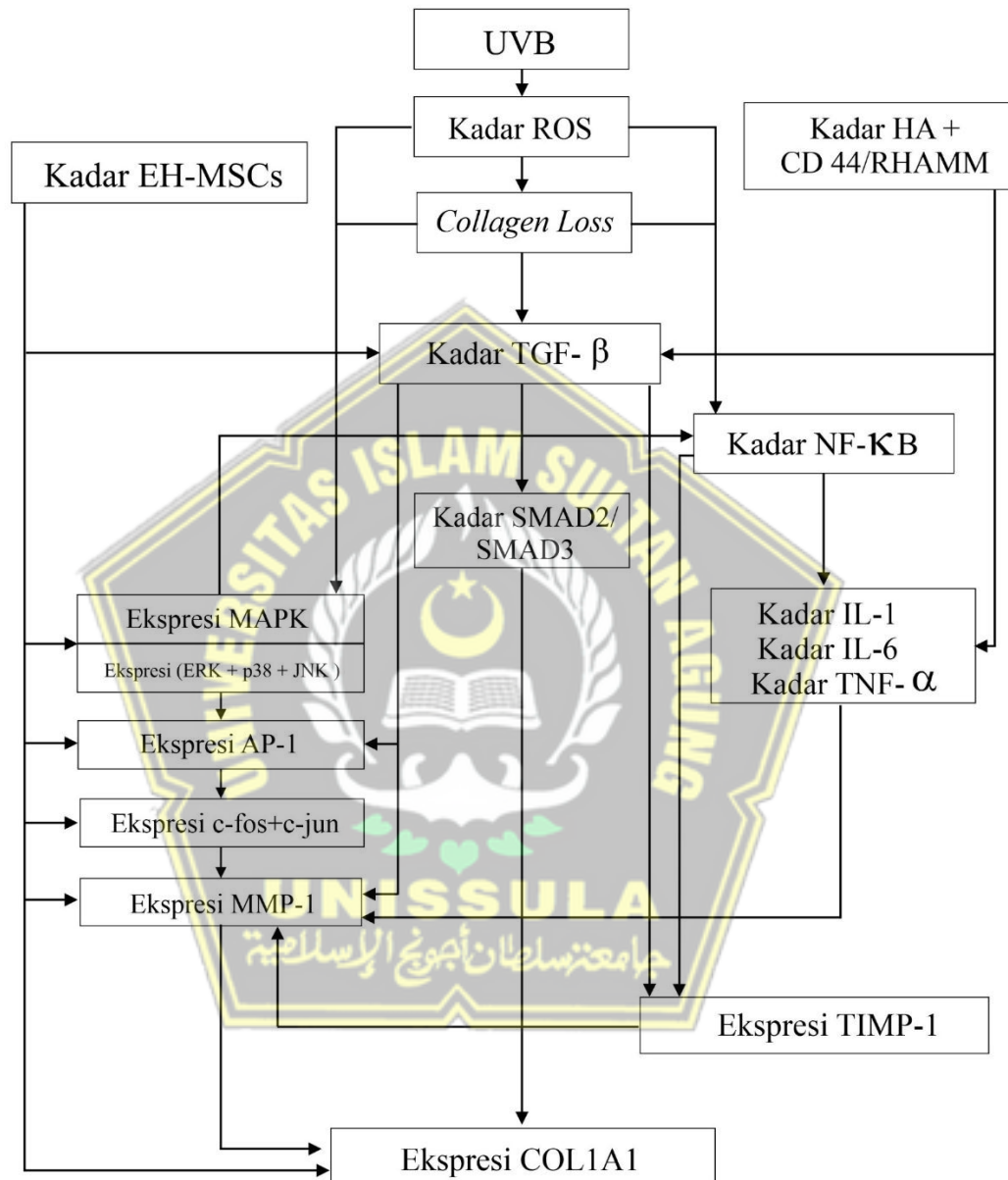
produksi *collagen* tipe I dan peningkatan TIMP-1, yang menghambat degradasi matriks oleh MMP.^{68,73} Jalur MAPK adalah sistem kaskade fosforilasi berurutan yang menghubungkan reseptor permukaan sel dengan efektor transkripsi inti yang meliputi ERK, JNK, dan p38, yang bekerja sebagai modulator sinergis bagi TGF- β /Smad. *Exosome* berikatan dengan reseptor di membran target dan memicu aktivasi ERK atau p38, yang kemudian memfosforilasi Smad2/3 dan meningkatkan stabilitas kompleks Smad sehingga ekspresi COL1A1 & TIMP-1 meningkat. ERK yang teraktivasi kemudian berpindah ke nukleus dan juga memfosforilasi faktor transkripsi seperti AP-1 (Fos/Jun), yang langsung mengikat promotor COL1A1 sehingga memperkuat sintesis *collagen* dan meningkatkan TIMP-1 sehingga menimbulkan efek profibrotik.^{74,75}

Paparan UVB meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-6, TNF- α , dan IL-1 β , yang memperburuk keadaan dengan menekan aktivitas fibroblas sehingga menurunkan kapasitas sintesis ECM termasuk COL1A1 dan memperkuat ekspresi MMP. *Exosome* dari MSCs membawa miRNA anti-inflamasi (misalnya miR-146a, miR-21) sehingga menekan inflamasi melalui penurunan NF- κ B.^{33,36,76}

Hyaluronic acid (HA) sebagai komponen terapi kombinasi bekerja melalui mekanisme yang komplementer dengan *exosome*. Interaksi antara HA dengan reseptor *Cluster of Differentiation 44* (CD44) dan reseptor untuk motilitas yang dimediasi hyaluronan/*Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility* (RHAMM) menginduksi produksi sitokin yang penting untuk

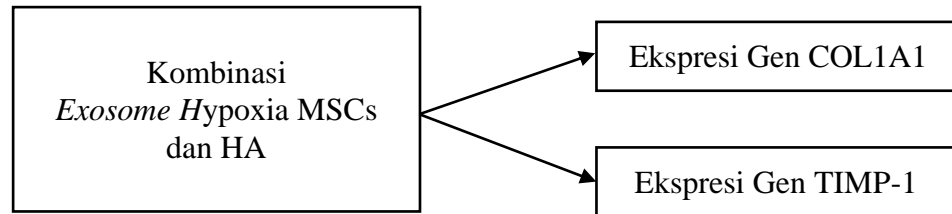
proses penyembuhan, termasuk TGF- β dan mengurangi produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , dan sitokin lain selama fase inflamasi.⁵ HA juga menginduksi ekspresi TIMP-1 melalui jalur CD44/*Janus Kinase 2* (JAK2)/ *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3), yang secara spesifik menghambat aktivitas MMP-9 dan MMP-1 untuk mengurangi degradasi *collagen*. HA juga berfungsi sebagai biostimulator untuk meningkatkan densitas *collagen*.⁷⁷ Penyuntikan HA ke dalam kulit meningkatkan dukungan struktural ECM dan mengaktifkan fibroblas, yang menginduksi sintesis *collagen*.⁶⁵ Meskipun HA terutama meningkatkan proliferasi fibroblas dan sintesis TIMP-1, efek anti-inflamasinya tidak sekuat MSCs, sehingga monoterapi HA cenderung mengalami relaps *collagen loss* jika dihentikan.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

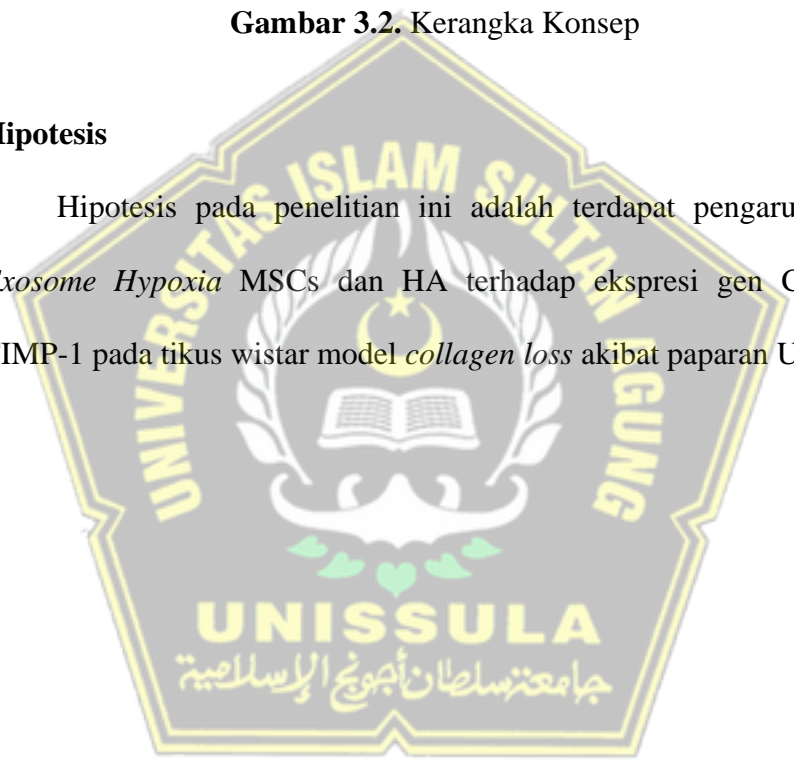
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat pengaruh kombinasi *Exosome Hypoxia* MSCs dan HA terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.

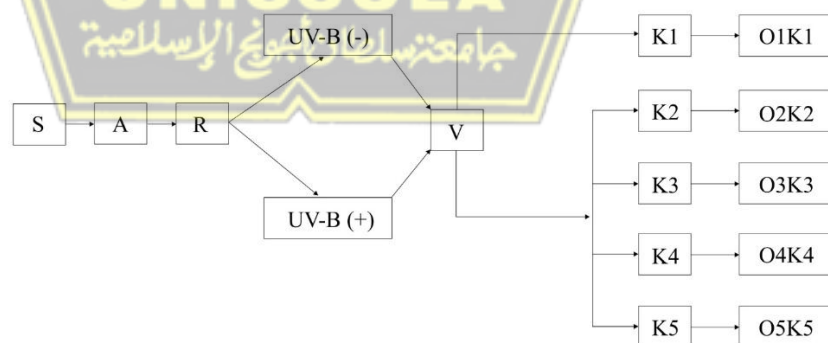


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

- S : *Sampling*
 R : Randomisasi alokasi
 UVB (+) : Pemberian paparan UVB
 UVB (-) : Tanpa paparan UVB
 A : Aklimatisasi
 V : Validasi pembentukan animal model *collagen loss*
 K1 : Tikus sehat tanpa paparan UVB
 K2 : Kontrol negatif (Tikus dengan paparan UVB + injeksi NaCl 0,9% 200 μ L secara subkutan)
 K3 : Kontrol positif (Tikus dengan paparan UVB + injeksi *Hyaluronic Acid* (HA) dosis 200 μ L secara subkutan)
 K4 : Perlakuan 1 (Tikus dengan paparan UVB + injeksi *Exosome hypoxia* MSCs secara subkutan)
 K5 : Perlakuan 2 (Tikus dengan paparan UVB + injeksi *Exosome hypoxia* MSCs dan HA sebanyak 200 μ L secara subkutan)
 O1K1 : Observasi ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 kelompok 1
 O2K2 : Observasi ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 kelompok 2
 O3K3 : Observasi ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 kelompok 3
 O4K4 : Observasi ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 kelompok 4
 O5K5 : Observasi ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 kelompok 5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Kombinasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) dan *Hyaluronic Acid* (HA).

4.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1.

4.2.2. Definisi Operasional

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

EH-MSCs adalah sediaan cair yang mengandung vesikel ekstraseluler berukuran nano (30–150 nm) yang dilepaskan oleh MSCs yang dikultur dalam kondisi hipoksia terkontrol

(1–5% O₂). EH-MSCs diperoleh dari *Animal Model Research Center, Stem Cell and Cancer Research (SCCR)*, Semarang. EH-MSCs diperoleh melalui proses isolasi dan medium kultur supernatan sel EH-MSCs *passage* ke-5, melalui teknik sentrifugasi diferensial dan filtrasi steril menggunakan membran 0,22 µm. EH-MSCs yang dihasilkan kemudian disuspensikan dalam larutan buffer fosfat disimpan pada suhu 2–8°C digunakan untuk perlakuan pada hewan coba. Pemberian EH-MSCs dilakukan dengan dosis 2.5 x 10⁵ sel dalam 200 µL NaCl 0,9% melalui injeksi subkutan pada area punggung tikus model sebanyak 200 µL per ekor.

Skala : nominal

4.2.2.2. *Hyaluronic Acid (HA)*

HA merupakan sediaan injeksi steril berbentuk gel viskoelastik transparan yang digunakan untuk terapi regeneratif kulit. HA yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari produk Staris Aquarius Hydro produksi PT. Haju Medical Indonesia dalam kemasan *syringe* steril berisi HA dengan konsentrasi 20 mg/ml. Untuk aplikasi pada mencit, 200 µL HA disuntikkan secara subkutan ke area dorsal tikus yang sebelumnya telah dibersihkan menggunakan antiseptik. Proses injeksi dilakukan secara

perlahan dengan jarum halus (ukuran 26–30G) pada sudut 30–45° agar cairan HA terdistribusi secara merata di jaringan subkutan.

Skala : nominal

4.2.2.3. Ekspresi Gen COL1A1

Ekspresi gen COL1A1 adalah tingkat transkripsi gen *collagen* tipe I alfa 1 (COL1A1), yaitu gen yang menyusun pembuatan rantai $\alpha 1$ pada *collagen* tipe I. Pengukuran COL1A1 menggunakan metode *Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) dari sampel jaringan kulit dorsal tikus yang diambil pada hari ke-27. Hasil pemeriksaan disajikan dalam bentuk ekspresi relatif dengan membandingkan ekspresi gen COL1A1 terhadap ekspresi *housekeeping gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) dengan rumus:

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

Keterangan:

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

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

Skala : rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen TIMP-1

Ekspresi gen TIMP-1 adalah tingkat transkripsi gen *tissue inhibitor of metalloproteinase-1* (TIMP-1), salah satu

inhibitor endogen dari keluarga protease matriks (*matrix metalloproteinases/MMPs*) yang berfungsi menahan aktivitas MMP. Pengukuran Ekspresi gen TIMP-1 menggunakan metode *Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) dilakukan dari sampel jaringan kulit dorsal tikus (± 5 mg) yang diambil pada hari ke-27. Hasil berupa nilai ekspresi relatif dengan membandingkan ekspresi gen TIMP-1 terhadap ekspresi *housekeeping gene* GAPDH.

Skala : rasio

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini merupakan tikus jantan galur Wistar berusia 8-12 minggu dengan berat badan 200-250 g yang diperoleh dari *Animal Model Research Center, Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) (Lampiran 3).

4.3.2. Kriteria Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

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

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

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*

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

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan cara *Simple Random Sampling*. Tikus putih jantan Galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K1 (tikus sehat tanpa paparan UVB), kelompok K2 kontrol negatif (tikus dipapar UVB dengan pemberian NaCl 0.9% secara subkutan), kelompok K3 Kontrol positif (tikus dipapar UVB dengan pemberian HA dosis 200 μ L secara subkutan), kelompok K4 (tikus dipapar UVB dengan perlakuan pemberian injeksi EH-MSCs sebanyak 200 μ L secara subkutan) dan kelompok K5 (tikus dipapar UVB dengan perlakuan pemberian kombinasi injeksi EH-MSCs 200 μ L dan HA 200 μ L secara subkutan).

4.3.4. Besar Sampel

Penentuan jumlah sampel minimal dilakukan sebagaimana direkomendasikan dalam pedoman desain penelitian eksperimental dan studi hewan laboratorium.⁷⁸ Berdasarkan prinsip tersebut digunakan pendekatan rumus Federer, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ sehingga didapat hasil 15.

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 tersebut didapatkan jumlah tikus 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu 6 ekor tikus perkelompok.

Keterangan:

t= banyaknya perlakuan

n= banyak sampel setiap perlakuan

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV *light* (*broadband* dengan *peak emission* pada 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm², pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air

minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data antara lain gunting jaringan, pinset jaringan, 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 adalah laptop.

4.4.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan meliputi gel base, *isoflurane*, xylazine, etanol, dan akuades sebagai bahan pendukung dalam proses perlakuan dan preparasi sampel. Primer spesifik digunakan untuk gen COL1A1 dan primer untuk gen TIMP-1 pada analisis ekspresi gen menggunakan metode RT-PCR.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan nomor dokumen 694/XII/2025/Komisi Bioetik (Lampiran 1).

4.5.2. Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

Rambut pada bagian punggung tikus dicukur seluas 4×4 cm sebelum paparan UVB untuk memastikan paparan yang merata pada permukaan kulit. Punggung tikus selanjutnya dipapar UVB *broadband* dengan puncak emisi pada panjang gelombang 302 nm

dengan dosis minimal eritema (*minimal erythema dose/MED*) sebesar 180 mJ/cm². Paparan UVB diberikan selama ±10 menit per sesi dengan jarak 20 cm, sebanyak lima kali per minggu (hari ke-1, 2, 4, 5, dan 7) selama dua minggu berturut-turut untuk membentuk model *photoaging*. Setelah periode paparan UVB selesai, tikus pada kelompok K3 diberikan injeksi HA secara subkutan pada hari ke-22, kelompok K4 diberikan injeksi EH-MSCs secara subkutan pada hari ke-22, sedangkan tikus pada kelompok K5 diberikan injeksi kombinasi EH-MSCs dan HA secara subkutan pada hari ke-22.

4.5.3. Pengambilan Sampel Jaringan

Sebanyak 2×2 cm sampel jaringan kulit dorsal subjek penelitian diambil pada hari ke-27 dengan pembiusan menggunakan inhalasi *isoflurane* dosis 3-5% selama 1 menit, kemudian dilakukan terminasi dengan teknik dislokasi servikal. Sampel jaringan dimasukkan ke dalam *tube* berisi RNAlater dan disimpan pada suhu -80°C hingga proses analisis dilakukan.

4.5.4. Validasi *Collagen Loss* akibat Paparan UVB Menggunakan Pengecatan *Masson Trichrome*

Sampel jaringan kulit yang sudah diperoleh kemudian dianalisis untuk melihat adanya *collagen loss* akibat paparan UVB dengan menggunakan metode pengecatan *Masson Trichrome*. Preparat jaringan terlebih dahulu dideparafinisasi, kemudian

diinkubasi dalam larutan Bouin yang telah dipanaskan pada suhu 54–64°C selama 60 menit untuk meningkatkan kontras pewarnaan, dilanjutkan dengan proses pendinginan dan pembilasan menggunakan air mengalir. Slide kemudian diwarnai menggunakan *Hematoxylin Besi Weigert* untuk visualisasi inti sel, diikuti dengan pewarnaan *Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin* untuk jaringan sitoplasmik. Diferensiasi jaringan dilakukan melalui inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat, kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan Aniline Blue untuk menandai serat kolagen secara spesifik. Untuk mempertajam warna, slide direndam dalam larutan asam asetat 1%, kemudian didehidrasi menggunakan alkohol 95%, ditutup dengan *mounting medium*, dan ditutup kaca penutup.

Setelah preparat siap, dokumentasi area jaringan representatif dilakukan menggunakan mikroskop digital dengan perbesaran tetap (100× atau 200×). Kuantifikasi kolagen selanjutnya dilakukan secara digital menggunakan perangkat lunak ImageJ. Analisis dilakukan dengan memilih opsi *Masson Trichrome* pada plugin *Color Deconvolution* untuk memisahkan kanal warna biru yang merepresentasikan serat kolagen. Ambang batas (*threshold*) pada hasil pemisahan warna biru diatur sehingga hanya area serat kolagen yang terdeteksi. Densitas kolagen kemudian dihitung dalam bentuk *Collagen Area Fraction* (CAF), yaitu perbandingan antara luas area

kolagen terhadap total luas area jaringan yang dianalisis, menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Densitas Collagen} = \text{Luas Area Berwarna Biru/Luas Total Jaringan} \times 100\%.$$

4.5.5. Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen COL1A1 dan TIMP-1 dengan RT-qPCR

Tujuan analisis menentukan perubahan relatif ekspresi mRNA gen pro-inflamasi COL1A1 dan gen regulator siklus sel TIMP-1 antar kelompok perlakuan dengan kuantifikasi yang sensitif, spesifik, dan terstandarisasi dengan proses sebagai berikut:

1. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA

Isolasi RNA total dari sampel dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol® (*Invitrogen Life Technologies*).

Kemurnian dan konsentrasi RNA dievaluasi melalui spektrofotometri (NanoDrop), sedangkan integritas RNA diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa. Sintesis cDNA dilakukan menggunakan iScript™ cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad, Catalog No. 1708891*) dengan bantuan *Reverse Transcriptase PCR Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad)*.

2. Analisis Ekspresi Gen COL1A1 dan ekspresi gen TIMP-1

Ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 dianalisis menggunakan metode *Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)*. Reaksi PCR dijalankan menggunakan iTaq™ Universal SYBR®

Green Supermix (Bio-Rad, Catalog No. 1725124) dalam tabung PCR 0,2 mL dengan volume total 20 μ L untuk setiap sampel. Amplifikasi dilakukan menggunakan sistem CFX96™ *Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) dengan kondisi siklus: pre-denaturasi 95°C selama 3 menit, diikuti 40 siklus denaturasi 95°C selama 10 detik, annealing/ekstensi 60°C selama 30 detik, dan dilanjutkan analisis kurva leleh (*melt curve*) untuk verifikasi spesifisitas amplifikasi.

3. Analisis Data

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

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di *Laboratorium Stem Cell and Cancer Research*, Jawa Tengah pada bulan November - Desember 2025.

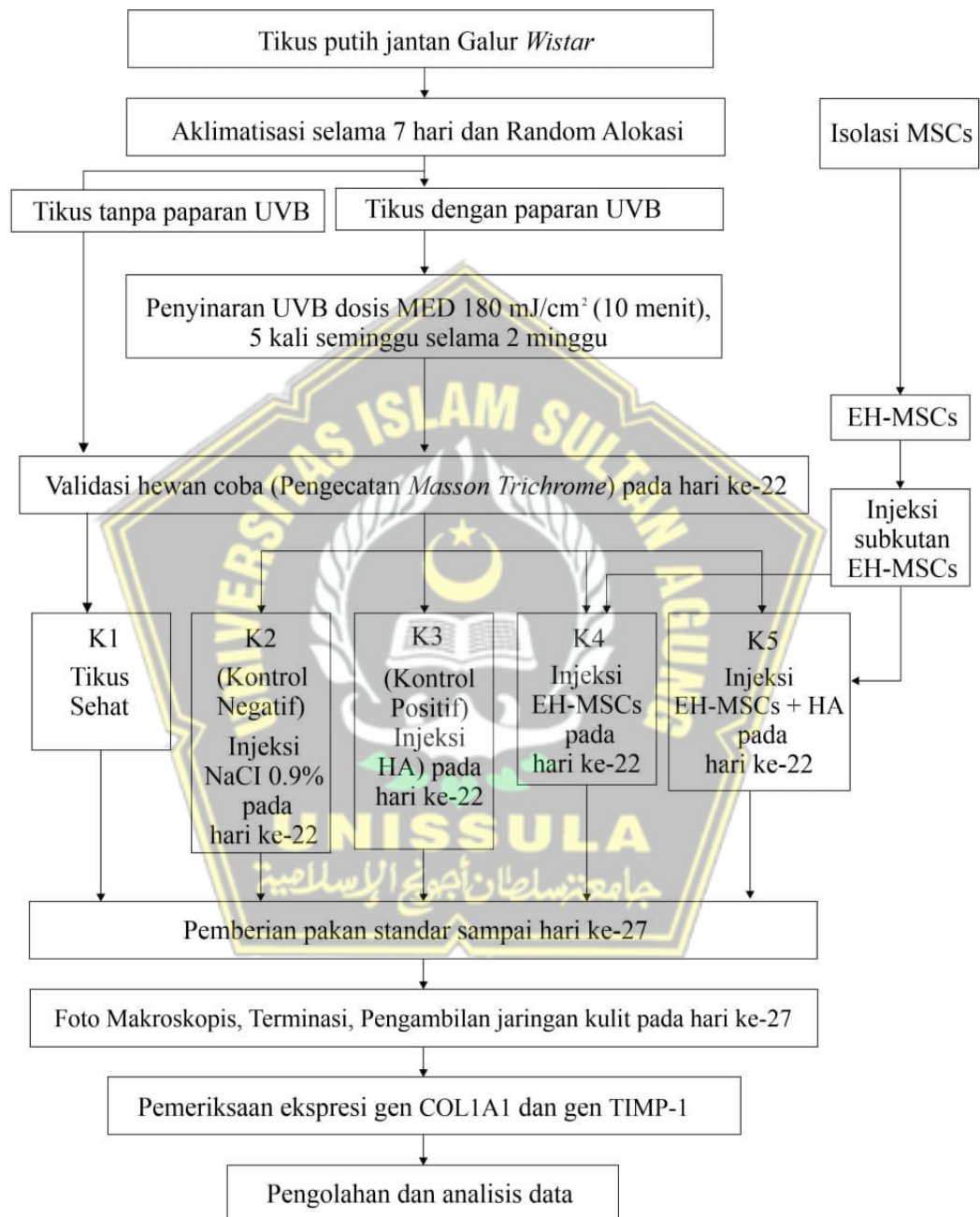
4.7. Analisis Data

Data ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 diuji normalitas distribusi data menggunakan *Shapiro-Wilk test*, sedangkan uji homogenitas varian data dilakukan dengan *Levene's test*. Data ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-

1 terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan varian homogen ($p > 0,05$), maka perbedaan antar kelompok dianalisis menggunakan *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* menghasilkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar kelompok.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

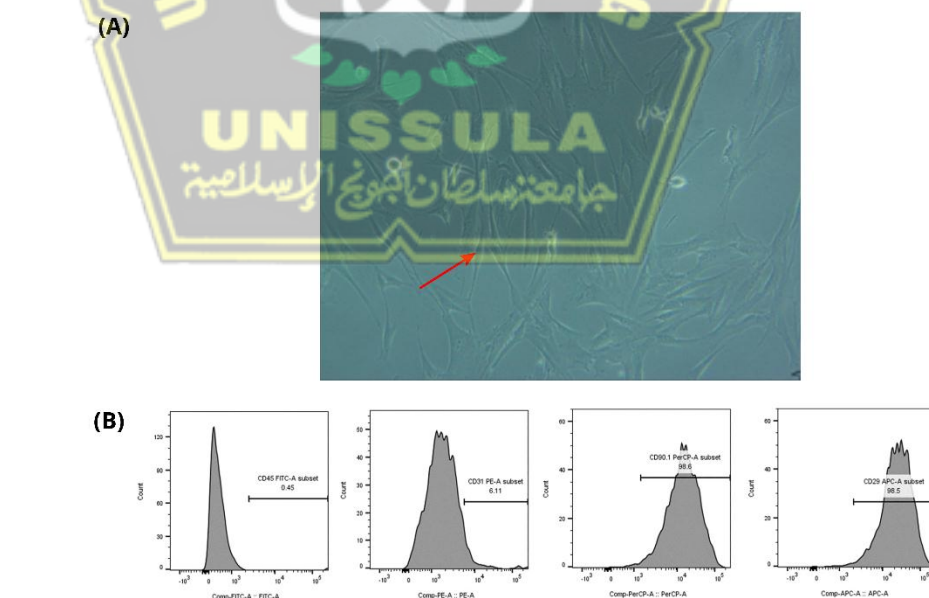
5.1. Hasil Penelitian

Penelitian eksperimental dilakukan pada bulan November-Desember 2025 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang Indonesia. Subjek penelitian yaitu tikus jantan galur wistar dengan berat badan 200-250 g berumur 8-12 minggu (Lampiran 4). Penelitian menggunakan 30 ekor tikus Wistar dan tidak ada tikus *drop out* selama penelitian berlangsung selama 27 hari termasuk 7 hari masa aklimatisasi. Penelitian terdiri dari 5 kelompok yaitu kelompok (K1) kontrol tikus sehat tanpa perlakuan, sedangkan 4 kelompok lainnya dipapar UVB 302 nm dengan intensitas energi 180 mJ/cm kemudian kelompok (K2) kontrol negatif diberikan NaCl 0,9%, kelompok (K3) kontrol positif diberikan injeksi *Hyaluronic Acid (HA)* sebanyak 200 µL secara subkutan, kelompok (K4) diberikan injeksi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* dosis 2.5×10^5 sel dalam 200µL NaCl 0,9% secara subkutan dan kelompok (K5) diberikan injeksi EH-MSCs dosis 2.5×10^5 sel dalam 200µL NaCl 0,9% dan HA sebanyak 200µL secara subkutan.

5.1.1. Hasil Validasi MSCs

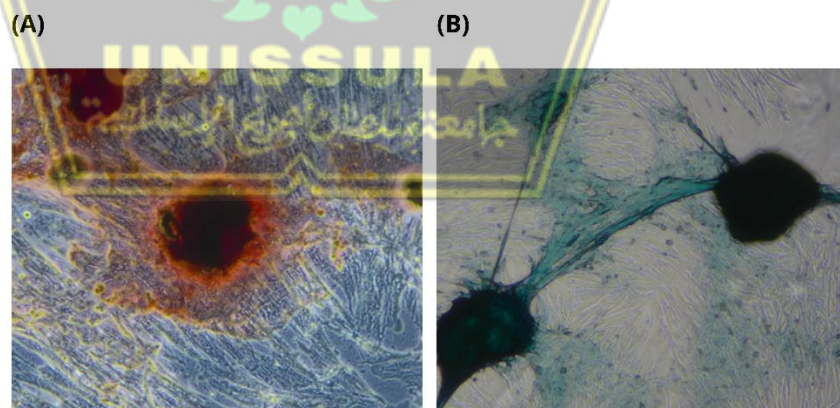
Isolasi *Mesenchymal Stem Cells (MSCs)* dilakukan di Laboratorium SCCR Semarang Indonesia, menggunakan *umbilical cord* tikus bunting. Setelah isolasi, sel-sel tersebut dikultur dalam kultur menggunakan medium khusus. Pada *passage* ke-5, hasil

kultur menunjukkan sel-sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi menyerupai *spindle* saat diamati menggunakan mikroskop (Gambar 5.1A). *Surface marker* MSCs divalidasi menggunakan analisis *flow cytometry* untuk mengevaluasi kemampuan MSCs dalam mengekspresikan *surface marker* spesifik. Hasil analisis *flow cytometry* terhadap populasi sel menunjukkan ekspresi marker positif MSCs yang tinggi, yaitu CD90 sebesar 98,6% dan CD29 sebesar 98,5%. Sebaliknya, *marker* negatif MSCs menunjukkan ekspresi yang sangat rendah, yaitu CD45 sebesar 0,45% dan CD31 sebesar 6,11%, seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.1B. Temuan ini mengonfirmasi bahwa populasi sel yang digunakan memiliki karakteristik yang sesuai dengan MSCs.



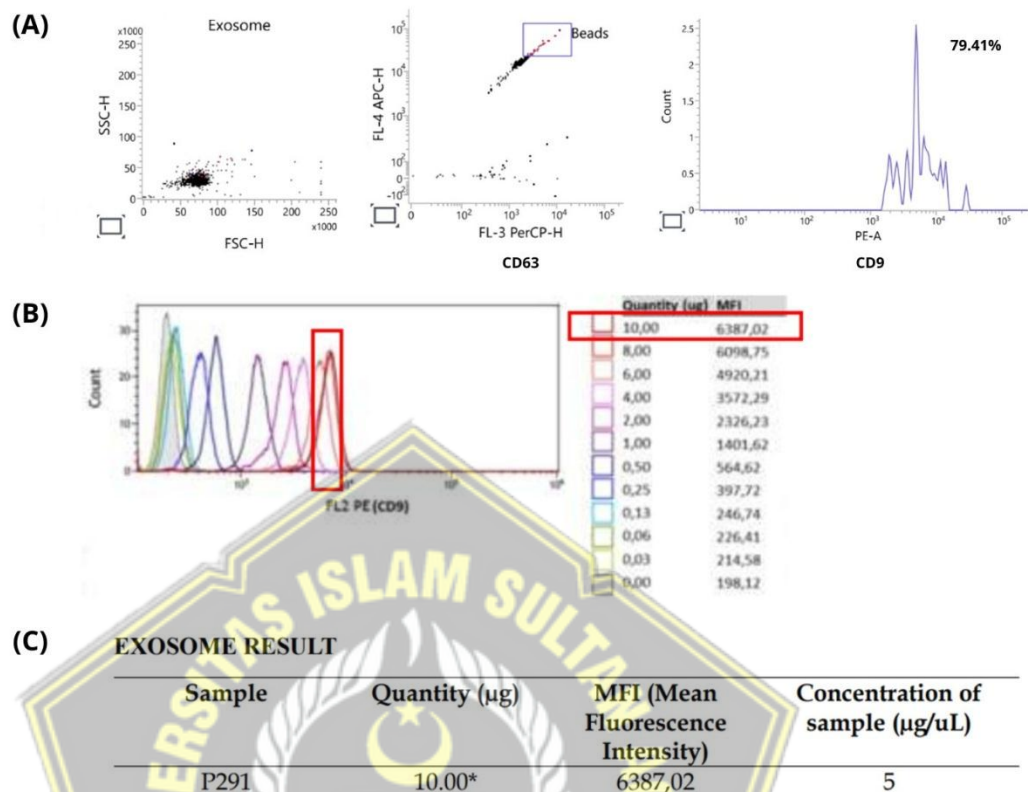
Gambar 5.1. (A) Isolasi MSCs dengan konfluensi 80% didapatkan gambaran sel berbentuk *spindle-like* (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90, dan CD29.

Hasil uji potensi diferensiasi MSCs menjadi berbagai jenis sel matur, termasuk osteosit dan kondrosit menunjukkan bahwa MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit, ditandai dengan adanya endapan kalsium yang divisualisasikan melalui pewarnaan *Alizarin Red* dengan perbesaran 200×, serta berdiferensiasi menjadi kondrosit, yang diindikasikan oleh deposit glikosaminoglikan (GAG) dan proteoglikan asam berwarna biru setelah pewarnaan *Alcian blue* dengan perbesaran 100× (Gambar 5.2.A dan 5.2.B). Karakteristik morfologi serta potensi diferensiasi osteogenik dan kondrogenik yang ditunjukkan mengonfirmasi identitas MSCs, sehingga sel tersebut dinyatakan layak untuk digunakan pada tahap pengujian selanjutnya.



Gambar 5.2. Kemampuan diferensiasi MSCs menjadi osteosit setelah pewarnaan *Alizarin Red* dengan perbesaran 200x (A) dan kondrosit setelah pewarnaan *Alcian Blue* dengan perbesaran 100× (B).

Sel MSCs kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi O₂ 5% selama 24 jam menggunakan *hypoxia chamber*. Medium kultur MSCs kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF) berdasarkan *molecular weight cut-off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 100-500 kDa yang mengandung *exosome*. Selanjutnya MSCs divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk memastikan bahwa sel yang terfiltrasi mengandung *marker exosome* dengan melihat kuantifikasi marker yang terbaca yaitu CD63, CD81, dan CD9. Hasil analisis *flow cytometry* menunjukkan bahwa sampel P291 mengandung *exosome* yang terdeteksi melalui pendekatan *bead-based* dan mengekspresikan *marker exosome* CD9 senilai 79,41% (Gambar 5.3.A). 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, yang ditandai dengan puncak fluoresensi pada area maksimum (Gambar 5.3.B). Analisis *flow cytometry* pada sampel *exosome* P291 menunjukkan bahwa penggunaan 10 µg sampel (5µg/µL) menghasilkan nilai MFI sebesar 6.387,02, yang menandakan intensitas fluoresensi tinggi dan kondisi pengukuran yang optimal (Gambar 5.3.C).

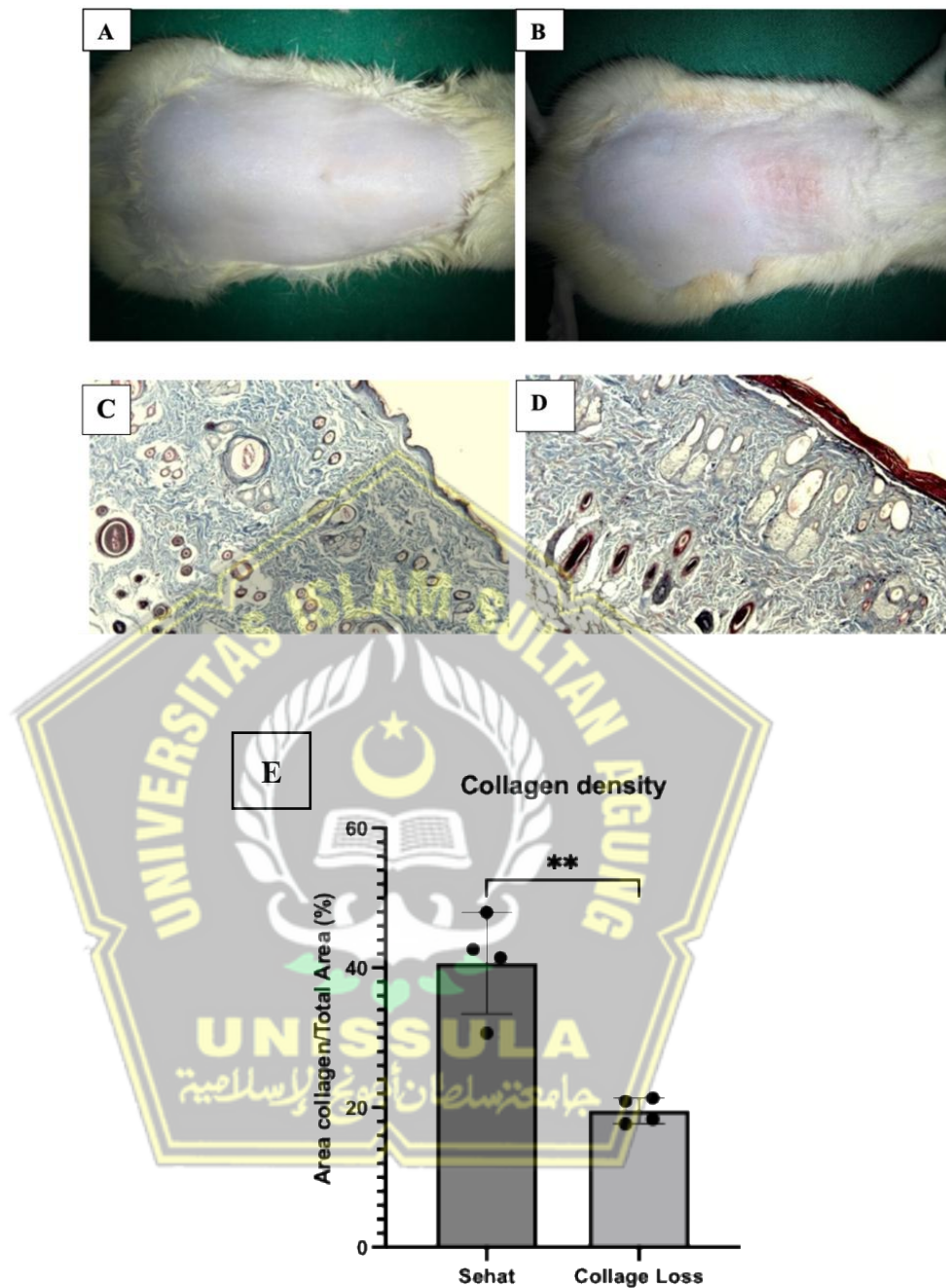


Gambar 5.3. Analisis EH-MSCs menggunakan *Flow Cytometry* (A). *Dynamic range* korelasi linear *exosome* dengan *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) (B). Tabel hasil kuantifikasi *exosome* (C).

5.1.2. Hasil Validasi *Collagen Loss*

Hasil makroskopis pengamatan menunjukkan adanya *collagen loss* pada tikus yang dipapar UVB dibandingkan dengan yang tidak dipapar (Gambar 5.4A dan 5.4B). Gambar 5.4.C-D menunjukkan hasil pemeriksaan histopatologi jaringan kulit tikus dengan pewarnaan *Masson Trichrome* sebelum dan sesudah dipapar UVB. Tampak epidermis dengan ketebalan normal, dermis berisi serabut *collagen* padat, tebal, berwarna biru intens dan terorganisir baik,

distribusi kolagen merata tanpa fragmentasi dan struktur adneksa kulit tampak normal sebelum dipapar UVB (Gambar 5.4C). Gambar 5.4D menunjukkan jaringan kulit sesudah dipapar UVB. Epidermis tampak menebal (akantosis) dibandingkan panel C, namun disertai penurunan intensitas warna biru *collagen*, serabut *collagen* lebih tipis, terfragmentasi, dan tidak teratur. Tampak pelebaran ruang stroma dermis dan terjadi disorganisasi matriks ekstraseluler di sekitar struktur adneksa. Hasil pengamatan kualitatif ini didukung oleh analisis kuantitatif densitas *collagen* (Gambar 5.4E). Perhitungan persentase ($\text{area } collagen / \text{total area} \times 100\%$) menunjukkan penurunan yang signifikan secara statistik ($p < 0.05$). Densitas kolagen pada kelompok sehat sebesar 34-48%, sementara pada kelompok model turun drastis menjadi 18-22%. Penurunan densitas *collagen* hingga setengah dari kondisi normal ini membuktikan bahwa induksi yang dilakukan telah berhasil menyebabkan degradasi *collagen* yang signifikan, sehingga hewan coba valid untuk digunakan sebagai model uji *collagen loss*.



Gambar 5.4. Hasil pengamatan makroskopis kulit tikus sebelum dipapar UVB (A) dan setelah dipapar UVB selama 14 hari (B). Hasil pengamatan histopatologi prepatat jaringan kulit tikus dengan pewarnaan *Masson Trichrome* sebelum dipapar UVB (C) dan setelah dipapar UVB selama 14 hari (D). Analisis kuantitatif densitas kolagen Tanda bintang (***) menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dengan uji *T-test* dibandingkan dengan kelompok sehat (E).

5.1.3. Ekspresi Gen COL1A1 pada Jaringan Kulit

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi COL1A1 tertinggi yaitu pada kelompok tikus sehat (K1), diikuti kelompok perlakuan tikus dipapar UVB lalu diberi injeksi EH-MSCs dosis 2.5×10^5 sel dalam 200uL NaCl 0,9% dan HA dosis 200uL secara subkutan (K5), diikuti oleh kelompok tikus dipapar UVB lalu diberi injeksi EH-MSCs dosis 2.5×10^5 sel dalam 200uL NaCl 0,9% secara subkutan (K4), kemudian diikuti oleh kelompok tikus dipapar UVB lalu diberi injeksi HA dosis 200uL secara subkutan (K3). Rerata ekspresi COL1A1 terendah adalah pada kelompok tikus dipapar UVB lalu diberi injeksi NaCl 0,9% dosis 200uL secara subkutan (K2).

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Parametrik pada ekspresi COL1A1

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 (n=6)	K2 (n=6)	K3 (n=6)	K4 (n=6)	K5 (n=6)	
Ekspresi COL1A1						
Mean	1,04 ± 0,32	0,48 ± 0,08	0,68 ± 0,16	0,90 ± 0,33	1,03 ± 0,30	
Std.deviasi						
<i>Shapiro Wilk</i> *	0,151	0,262	0,625	0,505	0,294	
<i>Levene test</i> *						0,060
<i>ANOVA</i> **						0,004

Keterangan: * Normal/homogen $p > 0,05$ **Berbeda signifikan $p < 0,05$

Seluruh kelompok ekspresi COL1A1 berdasarkan uji *Shapiro Wilk* berdistribusi normal dengan *p-value* > 0.05 dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene Test* menunjukkan hasil

yang homogen dengan p -value=0,06 (>0.05), maka selanjutnya data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan p -value 0,004 ($p<0.05$) untuk COL1A1, kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar pasangan kelompok (Tabel 5.2).

Tabel 5.2. Perbedaan Rerata Ekspresi COL1A1 Antar 2 Kelompok

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%		
				Batas Bawah	Batas Atas	
Ekspresi COL1A1	K1	K2*	0,001	0,2454	0,8680	
		K3*	0,024	0,0520	0,6746	
		K4	0,375	-0,1746	0,4480	
		K5	0,974	-0,3063	0,3163	
		K2	K3	0,213	-0,5046	0,1180
	K2	K4*	0,010	-0,7313	-0,1087	
		K5*	0,001	-0,8630	-0,2404	
		K3	K4	0,146	-0,5380	0,0846
		K5*	0,026	-0,6696	-0,0470	
		K4	K5	0,392	-0,4430	0,1796

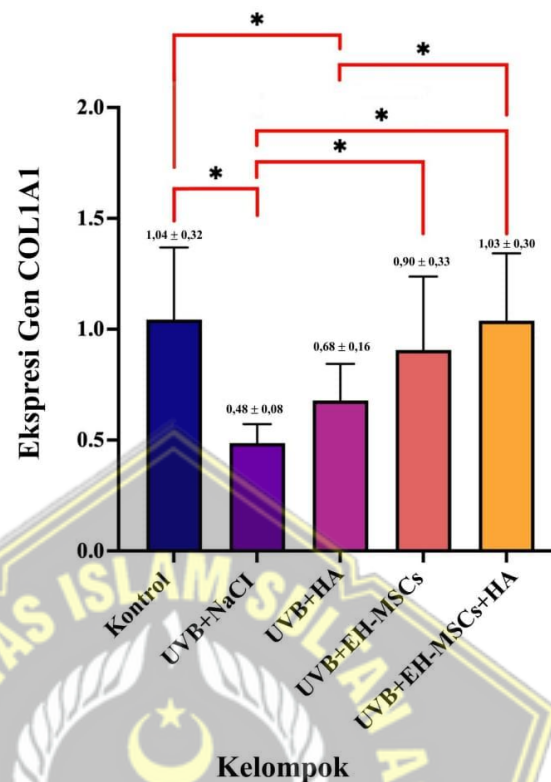
*Uji *Post Hoc LSD* dengan nilai signifikan $p<0,05$

Gambar 5.5 menunjukkan rerata ekspresi COL1A1 antara kelompok kontrol negatif K2 (UVB+NaCl) dengan kelompok K4 (UVB+EH-MSCSs) berbeda signifikan, begitu juga dibandingkan kelompok K5 (UVB+EH-MSCs+HA), namun tidak menunjukkan perbedaan signifikan dibanding kelompok K3 (UVB+HA). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan EH-MSCs maupun dengan EH-MSCs+HA dapat meningkatkan ekspresi COL1A1 secara

signifikan pada tikus akibat paparan UVB jika dibandingkan dengan dengan kelompok kontrol negatif, namun perlakuan dengan HA belum menyebabkan peningkatan ekspresi COL1A1 secara signifikan pada tikus akibat paparan UVB jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Perbandingan rerata ekspresi COL1A1 antara kelompok K3 dengan kelompok K5 menunjukkan perbedaan signifikan dengan p -value=0,026, namun tidak menunjukkan perbedaan signifikan jika dibandingkan kelompok K4 dengan p -value=0,146. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan EH-MSCs+HA dapat meningkatkan ekspresi COL1A1 secara signifikan pada tikus akibat paparan UVB jika dibandingkan dengan perlakuan HA, namun perlakuan dengan EH-MSCs belum menyebabkan peningkatan ekspresi COL1A1 secara signifikan pada tikus akibat paparan UVB jika dibandingkan dengan perlakuan HA.

Perbandingan rerata ekspresi COL1A1 antara kelompok K4 tidak menunjukkan perbedaan signifikan dibanding kelompok K5. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan UVB+EH-MSCs+HA tidak menyebabkan peningkatan ekspresi COL1A1 yang signifikan dibandingkan dengan perlakuan dengan EH-MSCs saja.



Gambar 5.5. Ekspresi Relatif gen COL1A1 pada jaringan kulit tikus model *collagen loss* pada semua kelompok. * $p < 0.05$

5.1.4. Ekspresi Gen TIMP-1 pada Jaringan Kulit

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa rerata ekspresi TIMP-1 tertinggi yaitu pada kelompok tikus sehat (K1), diikuti kelompok tikus dipapar UVB lalu diberi kombinasi injeksi EH-MSCs dan HA (K5), diikuti kelompok tikus dipapar UVB lalu diberi injeksi EH-MSCs (K4), kemudian diikuti kelompok tikus dipapar UVB lalu diberi injeksi HA (K3). Rerata ekspresi COL1A1 terendah adalah pada kelompok tikus dipapar UVB lalu diberi injeksi NaCl (K2).

Tabel 5.3. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Parametrik pada ekspresi TIMP-1

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 (n=6)	K2 (n=6)	K3 (n=6)	K4 (n=6)	K5 (n=6)	
Ekspresi TIMP-1						
Mean	1,08 ± 0,45	0,37 ± 0,14	0,55 ± 0,22	0,79 ± 0,28	0,99 ± 0,45	
Std.deviasi						
<i>Shapiro Wilk*</i>	0,581	0,509	0,362	0,594	0,616	
<i>Levene test*</i>						0,154
<i>ANOVA**</i>						0,006

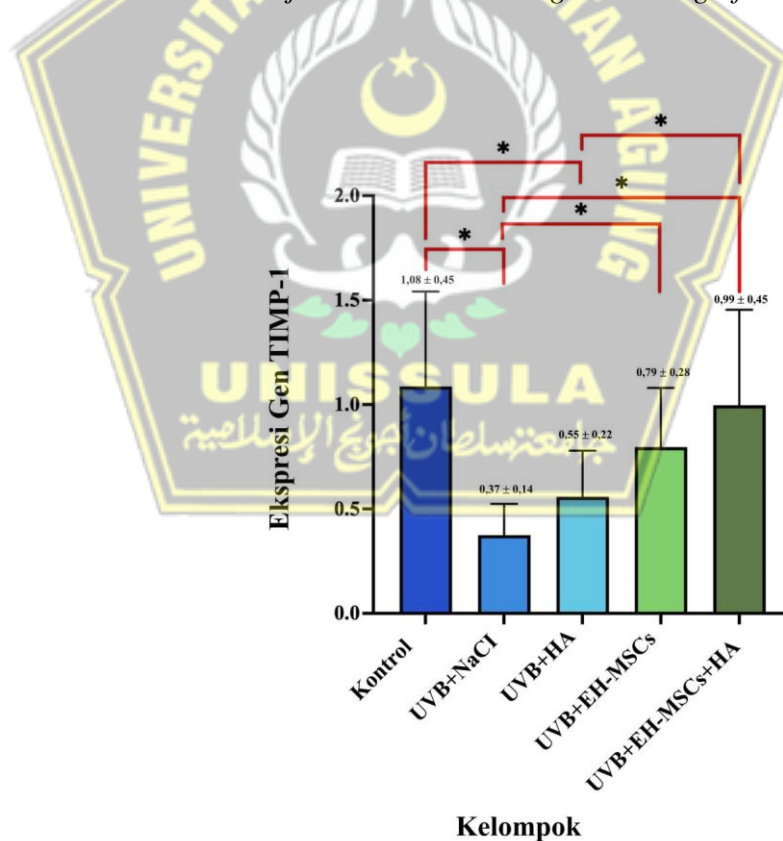
Keterangan: * Normal/homogen $p > 0,05$ **Berbeda signifikan $p < 0,05$

Seluruh kelompok kadar ekspresi TIMP-1 berdasarkan uji *Shapiro Wilk* berdistribusi normal dengan $p\text{-value} > 0,05$ dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene Test* menunjukkan hasil yang homogen dengan $p\text{-value} = 0,154 (> 0,05)$, maka selanjutnya data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan $p\text{-value} 0,006 (p < 0,05)$ untuk TIMP-1, kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar pasangan kelompok.

Tabel 5.4. Perbedaan Rerata Ekspresi TIMP-1 Antar 2 Kelompok

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
				Batas Bawah	Batas Atas
Ekspresi TIMP-1	K1	K2*	0,001	0,3109	1,1125
		K3*	0,012	0,1275	0,9291
		K4	0,149	-0,1108	0,6908
		K5	0,648	-0,3108	0,4908
	K2	K3	0,355	-0,5841	0,2175
		K4*	0,040	-0,8225	-0,0209
		K5*	0,004	-1,0225	-0,2209
	K3	K4	0,232	-0,6391	0,1625
		K5*	0,033	-0,8391	-0,0375
	K4	K5	0,314	-0,6008	0,2008

*Uji Post Hoc LSD dengan nilai signifikan $p < 0,05$



Gambar 5.6. Ekspresi Relatif gen TIMP-1 pada jaringan kulit tikus model *collagen loss* pada semua kelompok. * $p < 0,05$

5.2. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi EH-MSCSs dan HA terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB. Paparan UVB berulang selama 14 hari pada penelitian ini berhasil menunjukkan adanya *collagen loss* pada kulit punggung tikus yang ditandai dengan eritema ringan dan elastisitas kulit yang berkurang pada pemeriksaan makroskopis dan adanya penebalan epidermis, penipisan serabut *collagen*, pelebaran ruang stroma dermis dan disorganisasi matriks ekstraseluler pada pemeriksaan mikroskopis. Hasil ini sesuai dengan penelitian Najafabadi, et.al yang menyebutkan bahwa proses *photoaging* melibatkan respon kulit yang kompleks terhadap paparan UV, yang menyebabkan perubahan struktural dan molekuler yang signifikan⁷⁹. Paparan UVB meningkatkan produksi ROS, menyebabkan stress oksidatif, dan merangsang *collagen loss*, yang menyebabkan penuaan dini pada kulit. Paparan UVB mengaktifasi jalur pensinyalan MAPK dan mengganggu jalur pensinyalan TGF- β /Smad yang berujung pada penurunan ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1.^{2,3}

Terapi injeksi HA subkutan pada tikus yang mengalami *collagen loss* akibat paparan UVB terbukti meningkatkan ekspresi gen COL1A1 dan TIMP1. Hal ini menunjukkan bahwa HA berperan dalam mengaktifkan fibroblas dermal untuk meningkatkan sintesis kolagen dan memperbaiki homeostasis matriks ekstraseluler. Hasil ini sejalan dengan temuan Chylinska, et al. pada tahun 2025 yang menyebutkan bahwa HA berperan

penting dalam perbaikan dan regenerasi kulit pada kondisi penuaan, namun efek stimulasi HA masih terbatas, terutama bila digunakan secara tunggal.⁵

Pemberian EH- MSCs efektif dalam meningkatkan ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1. Rerata ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada kelompok yang diberi EH-MSCs lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang diberi HA. Hal ini menunjukkan bahwa EH-MSCs berperan lebih efektif dalam merangsang sintesis kolagen dan mengatur keseimbangan matriks ekstraseluler melalui modulasi gen yang terlibat dalam regenerasi jaringan. Hal ini sesuai dengan penelitian Nguyen, et al. bahwa *exosome* yang berasal dari *mesenchymal stem cells* mampu meningkatkan ekspresi gen *collagen* terkait serta meningkatkan sintesis *collagen* tipe I dan pengaturan TIMP.¹³

Pemberian injeksi subkutan kombinasi EH-MSCs dan HA menunjukkan rerata ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 yang paling tinggi di antara seluruh kelompok yang dipapar UVB, meskipun masih belum menyamai kelompok sehat. Hal ini sesuai dengan penelitian secara *in vivo* oleh Lee, et al. yang menyebutkan bahwa kombinasi EH-MSCs dan HA mempercepat regenerasi jaringan dengan meningkatkan deposisi kolagen serta ekspresi gen-gen terkait regenerasi dibandingkan HA saja.⁸⁰

Peningkatan ekspresi gen COL1A1 yang tidak lebih tinggi dibanding kelompok sehat mengindikasikan bahwa terjadi aktivasi jalur sintesis kolagen yang terkontrol dan tidak terjadi stimulasi fibroblas yang berlebihan. Hal tersebut penting, karena jika ekspresi COL1A1 pada

pemberian kombinasi melebihi ekspresi pada kelompok sehat, hal tersebut dapat mengarah pada aktivasi berlebihan jalur TGF- β /Smad dan potensi terjadinya fibrosis dermal. Peningkatan ekspresi gen TIMP-1 dibanding kelompok lain menunjukkan penekanan aktivitas MMP oleh paparan UVB dan perlindungan terhadap degradasi kolagen yang sedang terjadi. Namun karena nilainya tidak melebihi kelompok sehat, maka homeostasis sistem MMP-TIMP tetap berada dalam rentang fisiologis. Hal ini mengindikasikan bahwa kombinasi tersebut memperbaiki kerusakan yang terjadi, namun belum sepenuhnya mengembalikan dampak paparan berulang UVB.

EH-MSCSs diketahui mengandung berbagai *cargo* bioaktif, seperti miRNA, *growth factor-related signals*, dan protein regulator, yang berperan dalam modulasi aktivitas fibroblas serta regulasi keseimbangan MMP/TIMP. Kondisi hipoksia pada MSCs meningkatkan kandungan faktor regeneratif dalam *exosome*, sehingga memperkuat efek protektif dan reparatif terhadap jaringan yang mengalami kerusakan akibat paparan UVB.⁶⁰ Sementara itu, HA berperan sebagai komponen ECM yang mendukung migrasi dan proliferasi fibroblas, meningkatkan hidrasi jaringan, serta berfungsi sebagai *scaffold* biologis yang memfasilitasi kerja faktor bioaktif dari *exosome*.^{16,17} Kombinasi keduanya menghasilkan efek sinergis dalam memulihkan keseimbangan degradasi dan sintesis kolagen.¹¹

Jalur TGF- β /Smad merupakan jalur utama yang mengatur sintesis kolagen fisiologis pada kulit. Aktivasi TGF- β akan memicu fosforilasi Smad2/3, yang selanjutnya meningkatkan transkripsi gen kolagen, termasuk

COL1A1. Paparan UVB diketahui menghambat jalur TGF- β /Smad melalui peningkatan AP-1 dan sitokin inflamasi, sehingga menurunkan sintesis *collagen*.³³⁻³⁵ Peningkatan ekspresi COL1A1 pada kelompok yang mendapat kombinasi EH-MSCSs dan HA mengindikasikan adanya pemulihan sebagian aktivitas jalur TGF- β /Smad. Namun, karena ekspresinya tidak melebihi kelompok sehat, hal ini menunjukkan bahwa aktivasi jalur tersebut tetap berada dalam batas fisiologis dan tidak mengarah pada kondisi fibrogenik. Selain menekan jalur TGF- β /Smad, UVB juga mengaktifkan jalur MAPK yang berkontribusi terhadap peningkatan MMP melalui aktivasi AP-1. EH-MSCSs dilaporkan mampu menurunkan aktivasi MAPK dan menekan ekspresi sitokin inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 β , yang berperan dalam induksi MMP.⁸¹ Peningkatan ekspresi TIMP-1 pada kelompok perlakuan dalam penelitian ini mengindikasikan bahwa kombinasi EH-MSCSs dan HA berpotensi menekan jalur inflamasi dan MAPK yang diinduksi UVB, sehingga menurunkan degradasi *collagen* dan memperbaiki keseimbangan ECM.

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa *exosome* dari sel adiposit/*adipose-derived stem cells* (ADSCs) dapat menurunkan ekspresi MMP, meningkatkan produksi *procollagen* tipe I, serta mengaktifkan jalur TGF- β /Smad serta menekan jalur MAPK/AP-1.^{20,25} Hal ini mendukung teori bahwa *exosome* memodulasi homeostasis MMP-TIMP serta jalur TGF- β /Smad dan MAPK untuk memulihkan keseimbangan kolagen. Penelitian lain menyebutkan bahwa *exosome* yang berasal dari folikel rambut

manusia/human hair follicle mesenchymal stem cell-derived exosomes (HFMSCs) dapat meningkatkan ekspresi TGF- β 1 & p-Smad2/3, meningkatkan ekspresi *collagen type I*, dan menurunkan MMP-1 dalam model UVB.⁸² Hal ini membuktikan bahwa *exosome* dapat memengaruhi jalur TGF- β /Smad.

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa HA mengalami perubahan kuantitas dan metabolisme pada kulit yang mengalami *photoaging*, yang berpengaruh pada hilangnya hidrasi, elastisitas dan struktur matriks ekstraseluler, termasuk kolagen.⁸³ Hal ini mendukung teori bahwa *photoaging* secara langsung dapat memengaruhi HA, di mana hal ini juga memengaruhi struktur kolagen dermis. Penelitian lain menyebutkan bahwa injeksi HA di lapisan dermis menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 pada tikus yang dipapar UVB.⁸⁴ Hal ini menunjukkan bahwa HA dapat melindungi kolagen dari proses degradasi melalui penurunan MMP.

Penelitian ini memiliki keterbatasan karena tidak mengamati gambaran histologi jaringan kulit yang telah mengalami peningkatan ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1. Pengamatan jaringan kulit menggunakan pewarnaan *Masson Trichrome*, sebagaimana yang telah dilakukan saat validasi model *collagen loss* akibat paparan UVB, seharusnya juga dilakukan setelah pemberian perlakuan HA tunggal, EH- MSCs tunggal maupun kombinasi keduanya. Hal ini akan memberikan gambaran langsung mengenai perubahan deposisi *collagen*, ketebalan dermis, serta organisasi serabut *collagen* yang berkaitan dengan peningkatan

ekspresi gen secara molekuler, sehingga memperkuat korelasi antara temuan molekuler dan perubahan struktural jaringan kulit.

Keterbatasan lain dari penelitian ini adalah bahwa pemberian kombinasi EH-MSCs dan HA pada penelitian ini masih menggunakan EH-MSCs tunggal dan HA tunggal, belum menggunakan sistem penghantaran khusus yang mampu mempertahankan stabilitas, retensi lokal, dan pelepasan bertahap bahan aktif di jaringan kulit, sehingga efektivitas biologis yang diperoleh kemungkinan belum mencerminkan potensi terapeutik optimal.

Penelitian ini memiliki keterbatasan karena evaluasi yang dilakukan masih berfokus pada perubahan ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 sebagai indikator homeostasis kolagen, tanpa menganalisis secara lebih mendalam jalur sinyal molekuler yang mendasari efek terapi, seperti gen-gen yang terlibat dalam jalur TGF- β /Smad dan MAPK, sehingga mekanisme molekuler spesifik yang berperan dalam efek sinergis kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap perbaikan *collagen loss* akibat paparan UVB belum dapat dijelaskan secara komprehensif pada penelitian ini.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah:

1. Pemberian kombinasi injeksi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) dan *Hyaluronic Acid* (HA) berpengaruh terhadap ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB.
2. Ekspresi gen COL1A1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB adalah sebesar $0,48 \pm 0,08$, yang dipapar UVB dan diberi kombinasi EH-MSCs dan HA sebesar $1,03 \pm 0,30$, sedangkan pada kontrol sehat sebesar $1,04 \pm 0,32$.
3. Ekspresi gen TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB adalah sebesar $0,37 \pm 0,14$, yang dipapar UVB dan diberi kombinasi EH-MSCs dan HA sebesar $0,99 \pm 0,45$, sedangkan pada kontrol sehat sebesar $1,08 \pm 0,45$.
4. Ekspresi gen COL1A1 dan TIMP-1 pada tikus wistar model *collagen loss* akibat paparan UVB berbeda signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok yang diberi kombinasi EH-MSCs dan HA.

6.2. Saran

Penelitian selanjutnya diharapkan dapat:

1. Menganalisis gambaran histologis dermis kulit menggunakan metode *Masson Trichrome* setelah pemberian HA tunggal, EH-MSCs tunggal, maupun kombinasi EH-MSCs dan HA untuk mengetahui pengaruhnya terhadap deposisi kolagen, organisasi serabut kolagen, serta ketebalan dermis pada model *collagen loss* akibat paparan UVB.
2. Mengembangkan penelitian lanjutan dengan memformulasikan kombinasi EH-MSCs dan HA dalam sistem penghantaran yang lebih stabil seperti *hydrogel* berbasis HA, serta mempertimbangkan penelitian klinis awal untuk mengevaluasi keamanan, efektivitas, dan potensi terapi dalam pencegahan dan perbaikan *collagen loss*.
3. Mengembangkan penelitian lanjutan mengenai efek kombinasi EH-MSCs dan HA terhadap ekspresi gen yang terlibat dalam jalur TGF- β /Smad dan MAPK agar mekanisme kerja kombinasi EH-MSCs dan HA dalam memperbaiki *collagen loss* akibat paparan UVB dapat dipahami secara lebih komprehensif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SEG, Kang S, Fisher GJ, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol* [Internet]. 2006;168(6):1861–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.051302>
2. Mavrogenatou E, Papadopoulou A, Pratsinis H, Kletsas D. Senescence-associated alterations in the extracellular matrix: deciphering their role in the regulation of cellular function. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2023;325(3):C633–47.
3. Yokose U, Hachiya A, Sriwiriyanont P, Fujimura T, Visscher MO, Kitzmiller WJ, et al. The endogenous protease inhibitor TIMP-1 mediates protection and recovery from Cutaneous Photodamage. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2012;132(12):2800–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.204>
4. Chen F, Guo X, Wu Y. Skin antiaging effects of a multiple mechanisms hyaluronan complex. *Ski Res Technol*. 2023;29(6):4–11.
5. Chylińska N, Maciejczyk M. Hyaluronic Acid and Skin: Its Role in Aging and Wound-Healing Processes. *Gels*. 2025;11(4):15–7.
6. Lim NH, Oh SW, Kwon K, Yu E, Park SH, Cho JY, et al. UVB-Protective Effects and Its Mechanisms of *Vitis amurens* Rupr. Methanol Extract in Human Primary Dermal Fibroblasts. *J Food Biochem*. 2025;2025(1).
7. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2010;1803(1):55–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003>
8. Halim AO, Bagaskara A, Siswinugraha AP, Nabighdazweda MD, Aji P, Maswan P, et al. Indonesia Solar Energy Outlook 2025 [Internet]. Tumiwa F, Bintang HM, Citraningrum M, Wiranegara RY, editors. Institute for Essential Services Reform; 2024. Available from: <https://iesr.or.id/wp-content/uploads/2024/10/Indonesia-Solar-Energy-Outlook-2025-Digital-Version.pdf>
9. Hidayati N, Hatikhah NA, Putri WE, Widyaswari MS, Muhammad DS, Nissaussholihah N, et al. The effect of long exposure to uvb rays on histological features of wistar rats (*Rattus norvegicus*) in photoaging model. *Bali Med J*. 2023;12(3):3078–83.
10. 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;15(1):1–13.
11. Gui Q, Ding N, Yao Z, Wu M, Fu R, Wang Y, et al. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells: the wine in Hebe's hands to treat skin aging. *Precis Clin Med*. 2024;7(1).
12. Meng D, Li Y, Chen Z, Guo J, Yang M, Peng Y. Exosomes Derived from Antler Mesenchymal Stem Cells Promote Wound Healing by miR-21-

- 5p/STAT3 Axis. *Int J Nanomedicine*. 2024;19(November):11257–73.
13. Nguyen ST. Exosomes derived from mesenchymal stem cells: A novel agent for skin aging treatment. *Biomed Res Ther* . 2024;11(12):7003–14.
 14. 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*. 2025;22(1):9–14.
 15. Jiao X, Wang Z, Li Y, Wang T, Xu C, Zhou X, et al. Fullerenol inhibits tendinopathy by alleviating inflammation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11(March):1–12.
 16. Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, et al. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
 17. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3):253–8.
 18. Yu H, Zhang J, Yang L, Tian Y, Milne C, Jin P, et al. MSC-derived exosomes injectable hyaluronic acid hydrogel for enhanced chronic wound healing. *J Control Release [Internet]*. 2025;385:113985. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113985>
 19. Jin HC, Jin YS, Hai RC, Mi KL, Choon SY, Rhie GE, et al. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol [Internet]*. 2001;117(5):1218–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01544.x>
 20. Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep*. 2016;6(March):1–11.
 21. Hu, Shiqi, Zhenhua Li, Jhon Cores, Ke Huang, Teng Su, Phuong-Uyen Dinh K, Cheng. Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging. *ACS Nano*. 2019;176(1):139–48.
 22. Wang C, Wang M, Xu T, Zhang X, Lin C, Gao W, et al. Engineering bioactive self-healing antibacterial exosomes hydrogel for promoting chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration. *Theranostics*. 2019;9(1):65–76.
 23. Xu P, Xin Y, Zhang Z, Zou X, Xue K, Zhang H, et al. Extracellular vesicles from adipose-derived stem cells ameliorate ultraviolet B-induced skin photoaging by attenuating reactive oxygen species production and inflammation. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1–14.
 24. 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;29(7).
 25. 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;24(2).
26. Liu H, Dong J, Du R, Gao Y, Zhao P. Collagen study advances for photoaging skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2023;40(1):1–7.
 27. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3).
 28. Hwang J, Huang Y, Burwell TJ, Peterson NC, Connor J, Weiss SJ, et al. In Situ Imaging of Tissue Remodeling with Collagen Hybridizing Peptides. *ACS Nano*. 2017;11(10):9825–35.
 29. Ko YM, Kim TH. The Role of Ginsenoside Rg3 in Modulating Oxidative Stress, Apoptosis, and Angiogenesis: Implications for Skincare and Anticancer Therapies. *Biocell*. 2025;49(7):1142–68.
 30. Li X, Sun X, Kan C, Chen B, Qu N, Hou N, et al. COL1A1: A novel oncogenic gene and therapeutic target in malignancies. *Pathol - Res Pract* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2025 Sep 25];236:154013. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0344033822002576>
 31. Simon MP, Maire G PF. COL1A1 (collagen, type I, alpha 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.; 2001.
 32. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SFA, Robins SP, et al. *JClinInvest*2001_899. 2001;107(7):899–907.
 33. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: Role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2002;118(2):211–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01641.x>
 34. Pan X, Chen Z, Huang R, Yao Y, Ma G. Transforming Growth Factor β 1 Induces the Expression of Collagen Type I by DNA Methylation in Cardiac Fibroblasts. *PLoS One*. 2013;8(4).
 35. Devos H, Zoidakis J, Roubelakis MG, Latosinska A, Vlahou A. Reviewing the Regulators of COL1A1. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12).
 36. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Investig Dermatology Symp Proc*. 2009;14(1):20–4.
 37. Quan. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2013;176(10):139–48.
 38. Lee JS, Min JW, Gye SB, Kim YW, Kang HC, Choi YS, et al. Suppression of UVB-Induced MMP-1 Expression in Human Skin Fibroblasts Using Lysate of *Lactobacillus iners* Derived from Korean Women's Skin in Their Twenties. *Curr Issues Mol Biol*. 2024;46(1):513–26.
 39. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. *N Engl J Med*. 1997;337(20):1419–29.
 40. He T, Quan T, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Oxidative exposure impairs TGF- β pathway via reduction of type II receptor and SMAD3 in human skin fibroblasts. *Age (Omaha)*. 2014;36(3):1079–94.
 41. Qian H, Shan Y, Gong R, Lin D, Zhang M, Wang C, et al. Mechanism of action and therapeutic effects of oxidative stress and stem cell-based

- materials in skin aging: Current evidence and future perspectives. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;10(January):1–11.
42. Zhu F, Qu L, Xu R, Yuan Y, Zhang S, Chen Y. Synergistic anti - photoaging and anti - inflammatory effects of *Eucommia* and *Portulaca oleracea* extracts via TGF - β / Smad / IL - 17 pathway. 2025;1–19.
 43. Li Y, Zhao L, Li S, Ruan D, Xiong L, Tang J, et al. Skin-derived precursor conditioned medium alleviated photoaging via early activation of TGF- β /Smad signaling pathway by thrombospondin1: In vitro and in vivo studies. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2025 Oct 27];253:112873. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134424000332>
 44. Choi S Il, Jung TD, Cho BY, Choi SH, Sim WS, Han X, et al. Anti-photoaging effect of fermented agricultural by-products on ultraviolet B-irradiated hairless mouse skin. *Int J Mol Med.* 2019;44(2):559–68.
 45. Nan L, Guo P, Hui W, Xia F, Yi C. Recent advances in dermal fibroblast senescence and skin aging: unraveling mechanisms and pioneering therapeutic strategies. *Front Pharmacol.* 2025;16(June):1–15.
 46. Cherifi H, Naveau A, Robert LL, Gogly B. Isolation of Anti Ageing Molecules Secreted by Human Gingival Stem Cells. Protection of Collagen and Elastic Networks. *J Cosmet Dermatological Sci Appl.* 2014;04(03):156–65.
 47. Gu MJ, Lee HW, Yoo G, Kim D, Choi IW, Kim Y, et al. Protective effect of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. ethanolic extract against UVB-induced skin aging and photodamage in hairless mice. *Front Pharmacol.* 2023;14(June):1–14.
 48. Ma Y, Huang J, Gong J, Li L, Zhao Y, Jin Y, et al. Colla Corii Asini regulate collagen regeneration in UV exposure-induced skin photoaging in mice. *Chinese Med (United Kingdom).* 2025;20(1):1–23.
 49. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol.* 2000;1477(1–2):267–83.
 50. Hornebeck W, Lambert E, Petitfrère E, Bernard P. Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2025 Oct 23];87(3–4):377–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300908404001695?via%3Dihub>
 51. Hornebeck W. Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol* [Internet]. 2003 Dec 1 [cited 2025 Oct 23];51(10):569–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0369811403001986>
 52. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD La, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):1–53.

53. Lin TY, Wu PY, Hou CW, Chien TY, Chang QX, Wen KC, et al. Protective effects of sesamin against UVB-induced skin inflammation and photodamage in vitro and in vivo. *Biomolecules*. 2019;9(9).
54. 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.
55. Prasetyo A, Syafitri LM, Prabowo A, Alif I, Nurichsan A. Priming of Mesenchymal Stem Cells for Enhanced Interleukin-10 Secretion via Conditioned Medium from Lipopolysaccharide-Activated Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Int J Cell Biomed Sci*. 2024;2(5):167–74.
56. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Reports*. 2016;2(2):168–73.
57. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
58. Chang L, Fan WW, Yuan HL, Liu X, Wang Q, Ruan GP, et al. Role of umbilical cord mesenchymal stromal cells in skin rejuvenation. *npj Regen Med*. 2024;9(1).
59. Putra A. BASIC MOLECULAR STEM CELL. Unissula Press. 2019. 1–229 p.
60. Park YM, Lee MJ, Jeon SH, Hruzová 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.
61. 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;10(June):1–16.
62. 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;15(1):1–27.
63. 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. *Clin Interv Aging*. 2007;2(4):509–19.
64. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhovich R. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers (Basel)*. 2020;12:1800.
65. Shang L, Li M, Xu A, Zhuo F. Recent applications and molecular mechanisms of hyaluronic acid in skin aging and wound healing. *Med Nov Technol Devices*. 2024;23(95):100320.
66. 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;107(1):24–31.
67. Stoykova ID, Koycheva IK BB et al. Molecular approaches to prevent UV-induced premature skin aging: focus on phytochemicals as photoprotectants. *Phytochem Rev*. 2025;24:119–150.

68. Quan TH, He TY, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor β /Smad pathway in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2002;119(2):499–506.
69. 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;19(7).
70. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC, et al. The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(10):1779–83.
71. 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.
72. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *J Invest Dermatol.* 2009;129(4):994–1001.
73. Ju C, Liu D. Exosomal microRNAs from Mesenchymal Stem Cells: Novel Therapeutic Effect in Wound Healing. *Tissue Eng Regen Med.* 2023;20(5):647–60.
74. Shi M, Liu H, Zhang T, Zhang M, Tang X, Zhang Z, et al. Extracellular Vesicles Derived from Adipose Mesenchymal Stem Cells Promote Peritoneal Healing by Activating MAPK-ERK1/2 and PI3K-Akt to Alleviate Postoperative Abdominal Adhesion. *Stem Cells Int.* 2022;2022.
75. Tienda-Vázquez MA, Hanel JM, Márquez-Arteaga EM, Salgado-Álvarez AP, Scheckhuber CQ, Alanis-Gómez JR, et al. Exosomes: A Promising Strategy for Repair, Regeneration and Treatment of Skin Disorders. *Cells.* 2023;12(12).
76. Suh JH, Joo HS, Hong EB, Lee HJ, Lee JM. Therapeutic application of exosomes in inflammatory diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1–22.
77. Guida S, Galadari H, Vespasiani G, Pellacani G. Skin biostimulation and hyaluronic acid: Current knowledge and new evidence. *J Cosmet Dermatol.* 2024;23(2):701–3.
78. Sadiq IZ, Usman A, Muhammad A, Ahmad KH. Sample size calculation in biomedical , clinical and biological sciences research. *J Umm Al-Qura Univ Appl Sci [Internet].* 2025;11(1):133–41. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43994-024-00153-x>
79. Hajjaliasgary Najafabadi A, Soheilifar MH, Masoudi-Khoram N. Exosomes in skin photoaging: biological functions and therapeutic opportunity. *Cell Commun Signal .* 2024;22(1):1–13.
80. Lee JH, Won YJ, Kim H, Choi M, Lee E, Ryoou B, et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Wound Healing and Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13).
81. Luan Z, Liu J, Li M, Wang Y, Wang Y. Exosomes derived from umbilical cord-mesenchymal stem cells inhibit the NF- κ B/MAPK signaling pathway and reduce the inflammatory response to promote recovery from spinal

- cord injury. *J Orthop Surg Res.* 2024;19(1):1–13.
82. Cui H, Fu LQ, Teng Y, He JJ, Shen YY, Bian Q, et al. Human Hair Follicle Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Attenuate UVB-Induced Photoaging via the miR-125b-5p/TGF- β 1/Smad Axis. *Biomater Res.* 2025;29:1–16.
83. Šínová R, Pavlík V, Ondrej M, Velebný V, Nešporová K. Hyaluronan: A key player or just a bystander in skin photoaging? *Exp Dermatol.* 2022;31(4):442–58.
84. Tamon O, Wiraguna AAGP, Pangkahila W. Injeksi asam hialuronat di lapisan dermis menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 tikus yang dipajan sinar ultraviolet-B (UVB). *J Biomedik.* 2017;9(1):19–23.

