

**PENGARUH PEMBERIAN GEL TOPIKAL *SECRETOME*
HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCs)
TERHADAP EKSPRESI GEN IL-15 DAN IFN- γ
(Studi eksperimental *In Vivo* Tikus Jantan Galur Wistar
Model *Alopecia-Like* yang diinduksi *fluconazole*)**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2



**Carolina Kiwik Rahardja
MBK.22.19.010275**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2023**

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN GEL TOPIKAL *SECRETOME HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELL* (SH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI GEN IL-15 DAN IFN- γ (Studi eksperimental *In Vivo* Tikus Jantan Galur *Wistar Model Alopecia Like* yang diinduksi *fluconazole*)

disusun oleh:

Carolina Kiwik Rahardja
(MBK.22.19.010275)

yang dipertahankan di depan Tim Penguji
Oktober 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Dr. dr. Sri Priyanti Mulyani, Sp.A
NIK 210.105.097

Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Me
NIK. 210.199.050

Menyetujui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Me
NIK. 210.199.050

PERNYATAAN

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



Semarang, Oktober 2023

Carolina Kiwik Rahardja
(Carolina Kiwik Rahardja)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Carolina Kiwik Rahardja
Tempat/tanggal lahir : Serang/ 23 Agustus 1987
Agama : Katholik
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Mardi Yuana : Lulus tahun 1999
2. SMP Regina Pacis Bogor : Lulus tahun 2002
3. SMA Regina Pacis Bogor : Lulus tahun 2005
4. FK Universitas Pelita Harapan : Lulus tahun 2011
5. IM- Residency Training : Lulus tahun 2015
6. S2 Biomedik FK UNISSULA : 2022 - Sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua

Ayah : Eduard Kiwik Rahardja(Alm)

Ibu : Yenny Setiawaty

2. Suami : Freidlander Pangestu

3. Anak : Freyja Sarasvati K. Pangestu

KATA PENGANTAR

Pertama-tama penulis mengucapkan Puji Tuhan yang telah memberikan nikmat sehat dan keberkahan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan tesis ini untuk memenuhi dan melengkapi tugas akhir program magister pascasarjana (S2). Pada akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis dengan judul **“Pengaruh Pemberian Gel Topikal *Secretome Hipoksia Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs)* Terhadap Ekspresi Gen IL-15 dan IFN- γ (studi eksperimental in vivo pada Tikus Jantan Galur Wistar Model *Alopecia-Like* yang diinduksi *fluconazole*)”**

Penulisan tesis ini dilakukan penulis ditengah kesibukan yang cukup padat namun akhirnya dapat diselesaikan dengan motivasi ingin memberikaan manfaat keilmuan yang dimiliki penulis terutama dalam mencari manfaat terapi sekretom sel punca hipoksia mesenkimal pada pasien *alopecia like* di Indonesia.

Selama penulisan tesis ini, penulis banyak mendapatkan dukungan, bimbingan dan bantuan moral dan material dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Prof.Dr.H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr.dr.H Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Prof.Dr.dr.H. Agung Putra, M.Si.Med Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik sekaligus sebagai pembimbing II yang telah memberikan semangat motivasi dalam penyusunan hasil tesis ini.

4. Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp.A selaku pembimbing I dalam penelitian yang telah memberikan arahan dan saran yang konstruktif dalam penelitian ini.
5. Prof. Dr. dr. Hj. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E, Subsp.D.K.E, FINSDV, FAADV selaku penguji I yang telah memberikan saran dan kritik demi kesempurnaan penyusunan hasil tesis ini.
6. Dr. Dra. Atina Husaana, M,Si, Apt selaku penguji II yang telah meluangkan waktu, memberikan kritik dan saran untuk perbaikan laporan tesis.
7. Prof. Dr. Ir. Hj Titiek Sumarawati, M.Kes selaku penguji III yang telah memberikan masukan, semangat, dan membantu segala hal terkait dalam penyelesaian perbaikan tesis ini.
8. Orang Tua, Suami dan Putri tercinta yang telah memberikan doa, semangat, dukungan sehingga proposal tesis ini dapat disidangkan.

Akhirnya penulis memahami masih banyak kekurangan untuk dilakukan perbaikan sehingga proposal tesis ini dapat dilaksanakan. Akhirnya penulis mengucapkan banyak terima kasih, semoga Tuhan YME melimpahkan berkah dan rahmat kepada kita semua.

Semarang, Oktober 2023


Carolina Kiwik Rahardja
MBK.22.19.010275

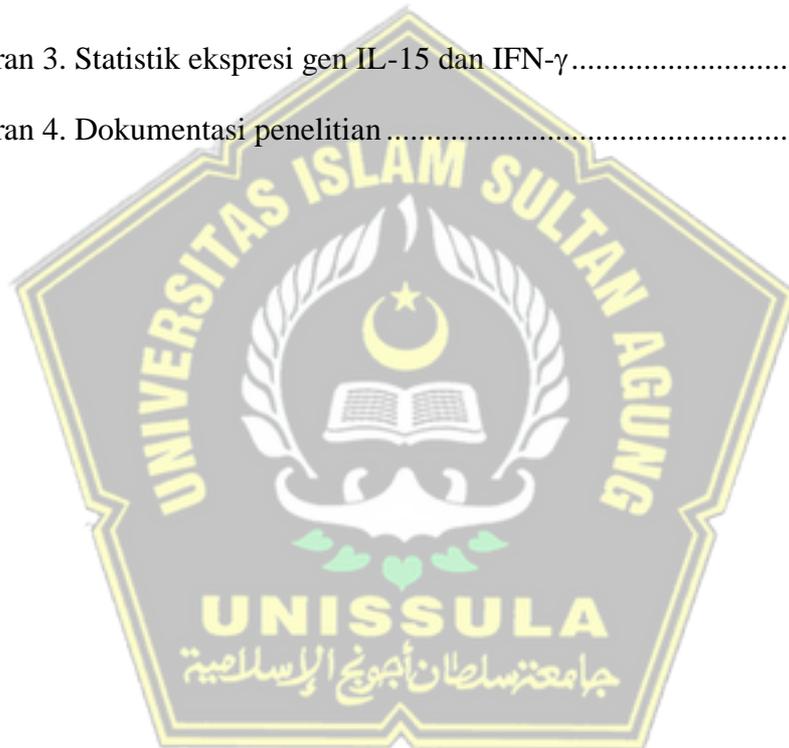
DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	i
PERNYATAAN	ii
RIWAYAT HIDUP	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR BAGAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3.1 Umum.....	4
1.3.2 Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Teoritis	4
1.4.2 Praktis.....	4
1.5 Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Interleukin - 15 pada <i>alopecia areata</i>	7

2.2 Interferon gamma IFN- γ pada <i>Alopecia Areata</i>	8
2.3 Pemeriksaan Interleukin-15 dan IFN- γ	10
2.4 <i>Alopecia Areata</i>	11
2.5 Telogen effluvium.....	18
2.6 Sekretom sel punca mesenkimal hipoksia.....	21
2.7 Sel punca tali pusat.....	24
2.8 Sinyal NF- κ B pada peradangan	24
2.9 IL-10 mediator anti peradangan.....	26
2.10 <i>Fluconazole Induced Alopecia</i>	26
BAB III KERANGKA TEORI , KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS	28
3.1 Kerangka Teori.....	28
3.2 Kerangka Konsep	30
3.3 Hipotesis	30
BAB IV METODE PENELITIAN	31
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	31
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	32
4.2.1. Variabel Penelitian.....	32
4.2.2. Defenisi Operasional.....	32
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	33
4.3.1. Subyek Penelitian	33
4.3.2. Sampel Penelitian	33
4.4. Teknik Pengambilan Sampel Penelitian.....	34
4.5. Besar Sampel.....	35
4.6. Alat dan Bahan.....	35
4.6.1. Alat.....	35

4.6.2. Bahan	36
4.7. Cara Penelitian	36
4.7.1 Perolehan Ethical Clearance	36
4.7.2 Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	36
4.7.3 Proses Hipoksia.....	37
4.7.4 Pembuatan Sediaan Gel	37
4.7.5 Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	38
4.7.6 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA	41
4.7.7 Pembacaan IL-15 dan IFN γ dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	43
4.8 Tempat dan Waktu Penelitian	43
4.8.1 Tempat Penelitian	43
4.8.2 Waktu Penelitian.....	44
4.9 Analisa Data.....	44
4.10 Alur Penelitian	46
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
5.1 HASIL PENELITIAN.....	48
5.1.1 Isolasi dan diferensiasi MSCs menjadi osteosit dan berdiferensiasi menjadi Adiposit.....	48
5.1.2 <i>Profiling</i> kandungan biomolekul SH-MSCs	49
5.1.3 Validasi pembuatan animal model <i>Alopecia Like</i>	51
5.1.5 Efek Pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% pada ekspresi gen IL- 15.....	55
5.1.6 Efek Pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% pada ekspresi gen IFN- γ	56
5.2 PEMBAHASAN	58

BAB VI KESIMPULAN	64
6.1 Kesimpulan	64
6.2 Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN.....	64
Lampiran 1. Jadwal Waktu Penelitian	64
Lampiran 2. <i>Ethical Clearance</i>	65
Lampiran 3. Statistik ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ	66
Lampiran 4. Dokumentasi penelitian	69



DAFTAR SINGKATAN

AA	: <i>Alopecia Areata</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IL-15	: <i>Interleukin-15</i>
IL-15RB	: <i>Interleukin-15 receptor beta</i>
NKG2D +	: <i>Natural killer group 2D</i>
CD8 +	: <i>Cluster of differentiation</i>
JAK	: <i>Janus Kinase</i>
hORSC	: <i>hair Outer Root Sheath Cell</i>
MSCT	: <i>Mesenchymal Stem Cell Therapy</i>
STAT	: <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
NLRP3	: <i>Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3</i>
UC-MSC	: <i>Umbilical cord mesenchymal stem cell</i>
CXCL	: <i>The chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
SH-MSCs	: <i>Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
ELISA	: <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
HLA	: <i>Human leucocyte antigen</i>
ALI	: <i>Acute lung injury</i>
ARDS	: <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
CYP26A1	: <i>Cytochrome P450 26A1</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas penelitian	5
Tabel 5.1 Analisis kandungan molekul SH-MSCs	50
Tabel 5.2 Data hasil analisis statistik ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ	54
Tabel 5.3 Uji <i>Post Hoc</i> LSD kadar IL-15 pada masing-masing kelompok	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Penghambatan janus kinase pada <i>alopecia</i>	8
Gambar 2.2 IFN- γ Pada Folikel Rambut.....	10
Gambar 2.3 <i>Alopecia Areata</i> Tipe Retikularis	16
Gambar 2.4 <i>Alopecia Areata</i> Tipe Sisiapho.....	16
Gambar 2.5 <i>Alopecia Areata</i> Tipe Ophiasis	16
Gambar 2.6 <i>Alopecia Areata</i> tipe Difus.....	17
Gambar 2.7 Sumber mesenchymal stromal cell yang dikultur dalam medium dan efek terhadap kulit.	23
Gambar 5.1 hasil kultur MSCs sel berbentuk <i>spindle-like</i> dengan pembesaran 100x.	48
Gambar 5.2 Analisis <i>Flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90.1 , CD29, CD45 dan CD31	49
Gambar 5.3 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit (kiri) dan (kanan) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan <i>alizarin red</i> dan <i>oil red</i> pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam).....	49
Gambar 5.6 Grafik Ekspresi gen IL-15 pada tiap kelompok penelitian	55
Gambar 5.7 Grafik Ekspresi gen IFN- γ pada tiap kelompok penelitian.....	57

DAFTAR BAGAN

Bagan 3.1 Kerangka Teori	29
Bagan 3.2 Kerangka Konsep.....	30
Bagan 4.1 Skema Rancangan Penelitian.....	32
Bagan 4.2 Alur penelitian	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Waktu Penelitian	64
Lampiran 2. <i>Ethical Clearance</i>	65
Lampiran 3. Statistik ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ	66
Lampiran 4. Dokumentasi penelitian	69



ABSTRAK

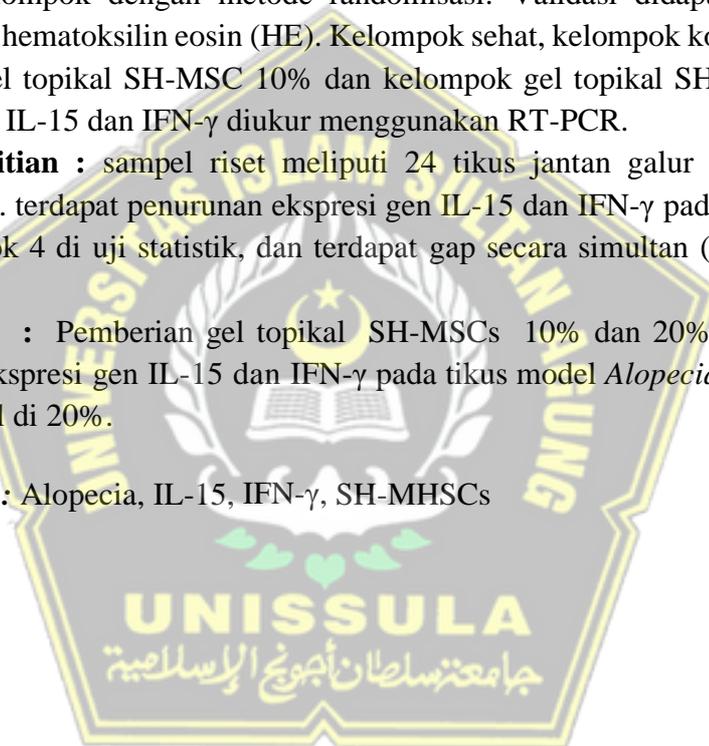
Latar Belakang : *Alopecia areata* (AA) adalah kelainan rambut yang dimediasi imun. Terjadi peningkatan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada penderita AA. Riset ini tujuannya guna mencari tahu dampak pemberian gel topikal SH-MSCs atas penurunan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada tikus jantan galur *Wistar* model *Alopecia Like*.

Metode : Riset eksperimental *Post Test Only Control Group Design*. Subyek risetnya ialah tikus wistar jantan model *alopecia like* diinduksi *flukonazole* dibagi dalam 4 kelompok dengan metode randomisasi. Validasi didapatkan dengan pemeriksaan hematoksilin eosin (HE). Kelompok sehat, kelompok kontrol negatif, kelompok gel topikal SH-MSC 10% dan kelompok gel topikal SH-MSCs 20%. Ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ diukur menggunakan RT-PCR.

Hasil Penelitian : sampel riset meliputi 24 tikus jantan galur wistar model *alopecia like*. terdapat penurunan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada kelompok 3 dan kelompok 4 di uji statistik, dan terdapat gap secara simultan ($p < 0.05$) antar kelompok.

Kesimpulan : Pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% memberikan penurunan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada tikus model *Alopecia Like* dengan dosis optimal di 20%.

Kata Kunci : Alopecia, IL-15, IFN- γ , SH-MHSCs



ABSTRACT

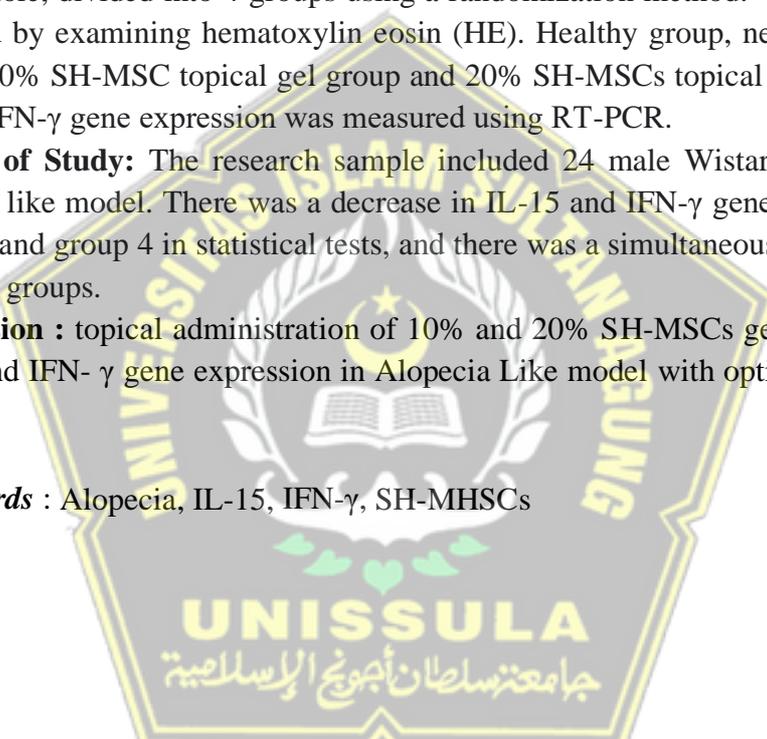
Background : Alopecia areata (AA) is an immune-mediated hair disorder. There was an increase in IL-15 and IFN- γ gene expression in AA sufferers. The aim of this research is to find out the impact of topical administration of SH-MSCs gel on reducing IL-15 and IFN- γ gene expression in male Wistar mice with the Alopecia Like model.

Method: Experimental research Post Test Only Control Group Design. The research subjects were male Wistar rats with alopecia-like model induced by fluconazole, divided into 4 groups using a randomization method. Validation was obtained by examining hematoxylin eosin (HE). Healthy group, negative control group, 10% SH-MSC topical gel group and 20% SH-MSCs topical gel group. IL-15 and IFN- γ gene expression was measured using RT-PCR.

Results of Study: The research sample included 24 male Wistar rats with the alopecia like model. There was a decrease in IL-15 and IFN- γ gene expression in group 3 and group 4 in statistical tests, and there was a simultaneous gap ($p < 0.05$) between groups.

Conclusion : topical administration of 10% and 20% SH-MSCs gel reduced the IL-15 and IFN- γ gene expression in Alopecia Like model with optimum dose of 20%.

Key Words : Alopecia, IL-15, IFN- γ , SH-MHSCs



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alopecia secara umum ialah kerontokan rambut dengan berbagai bentuk yaitu bercak, sebagian, difus, atau seluruhnya. Selain itu, beberapa bentuk *alopecia* bersifat sementara atau reversibel. *Alopecia* seringkali dialami wanita, pria, serta berhubungan dengan beban psikologis yang signifikan.¹ *Alopecia areata* (AA) adalah kelainan rambut yang dimediasi imun, tidak menimbulkan jaringan parut. Kaskade patogenesis pada *alopecia areata* termasuk sitokin dan molekul lain yang mengoordinasikan pertumbuhan rambut siklis. Masalah kerontokan rambut lain meliputi telogen effluvium dimana kondisi tersebut lebih bersifat akut dan sementara pada *alopecia areata*. Pemicu telogen effluvium yaitu penggunaan narkoba, stress fisiologis, kehamilan, dan stress emosional.^{2,3} Pengobatan untuk *alopecia areata* perlu memikirkan sumber masalah yaitu gangguan kaskade imun dan pensinyalan sitokin, pengobatan yang ada saat ini seperti minoxidil sebagai gold standar yang bersifat vasodilator belum tepat untuk kasus *alopecia areata* oleh karena itu diperlukan pendekatan terapi yang aman untuk jangka panjang, antara lain dengan *stem cell* dan derivatnya.

Pasien *alopecia areata* memiliki kadar IFN- γ dan IL-15 yang jauh lebih tinggi dibandingkan rata-rata kelompok kontrol.⁴ Disamping itu, kadar IL-15 dan status penyakit saling berkorelasi.⁴ Sitokin pleiotropik interleukin-15 (IL-15) telah terbukti memiliki efek biologis pada berbagai jenis sel. Sitokin ini mempengaruhi fungsi sistem kekebalan tubuh, baik *innate dan adaptive*, dan memainkan peran

penting dalam respon kekebalan terhadap infeksi dan inflamasi. Inhibisi pada reseptor IL-15 beta (IL-15RB) menyebabkan penurunan jumlah NKG2D + CD8 + sel T di kulit sehingga mencegah *alopecia* pada model hewan *alopecia like*.^{5,6}

Inhibisi interferon (IFN- γ), IL-2 atau reseptor IL-15 mencegah progresifitas *alopecia areata* dengan meminimalkan akumulasi sel T CD8 dan NKG2D pada kulit dan mengurangi respon IFN- γ pada model hewan dengan *alopecia like*.⁶

Sebuah studi mendapatkan *hemapoietic mesenchymal stem cell* (HMSCT) dapat memengaruhi pensinyalan *reentry* anagen dan pertumbuhan rambut pada sel selubung akar luar rambut (hORSC). Efek imunomodulator MSCT pada hORSCs berkaitan dengan penurunan IFN- γ , stimulasi Wnt / β -catenin dan penghambatan jalur pensinyalan JAK / STAT, dan aktivasi inflamasi NLRP3 Hasilnya menunjukkan bahwa hORSCs yang memiliki lingkungan serupa dengan AA dan diberi MSCT menunjukkan adanya peningkatan viabilitas, migrasi, dan ekspresi hORSC yang diregulasi ulang anagen.⁷

Studi berbasis komunitas di India menemukan bahwa kasus rambut rontok pada peserta studi mencapai 60,3%.⁸ Sebuah studi di Nigeria menyimpulkan bahwa 80,6% dari peserta studi berusia antara 20 sampai 29 tahun menderita *alopecia*.^{9,10}

Sebuah studi menyimpulkan bahwa masalah kerontokan rambut umum lebih sering terjadi pada wanita dibandingkan pria.¹¹ Jadi dapat dikatakan *Alopecia* merupakan masalah yang umum, dapat terjadi pada siapapun dan dapat mempengaruhi psikologi. Bahkan 47% pasien kemoterapi merasakan trauma pada *alopecia*.¹²

Secretome Hypoxia Mesenchymal stem cells (SH-MSCs) memiliki pengaruh pada ekspresi gen IL-15 dan IFN gamma (IFN- γ) dalam modulasi respon imun dan

inflamasi, sehingga dapat dijadikan terapi berbasis sel untuk gangguan imun serta penyakit inflamasi. Media kultur yang dipergunakan mengolah sel induk, yang dikenal sebagai SH-MSCs, kaya akan faktor anti-inflamasi seperti *transforming growth factor* (TGF- β) dan interleukin 10 (IL-10), yang diperoleh melalui *Tangential Flow Filtration* (TFF) teknik filtrasi.^{14,15} SH-MSCs adalah kandidat yang menarik untuk pengobatan berbagai macam penyakit karena sifatnya seperti pembelahan, regenerasi, diferensiasi, homing, dan engraftment. *Stem cell* mesenkimal tali pusat (UC-MSC) memiliki potensi yang tinggi untuk berdiferensiasi menjadi sel lain dan imunogenisitas yang rendah.^{13,14}

Berbagai penelitian sebelumnya menunjukkan adanya potensi dari SH-MSCs terhadap penurunan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ . Penelitian ini bermaksud mengevaluasi pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs dosis 20 μ L dan 40 μ L atas ekspresi gen IL-15 juga IFN- γ pada model tikus galur *Wistar* dengan *alopecia like*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada model tikus galur *Wistar* dengan model *alopecia like*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Umum

Riset ini tujuannya guna pembuktian akankah pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% berpengaruh atas penurunan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada model tikus galur Wistar dengan *alopecia like* yang diinduksi paparan *fluconazole*.

1.3.2 Khusus

1. Guna pembuktian juga menganalisis perbedaan rata-rata pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/ tikus/ hari terhadap penurunan ekspresi gen IL-15 pada model tikus galur Wistar dengan *alopecia like* antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.
2. Guna pembuktian juga menganalisis perbedaan rata-rata pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/ tikus/ hari atas penurunan ekspresi gen IFN- γ pada model tikus galur Wistar dengan *alopecia like* antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Teoritis

Temuan riset ini diharap bisa menambah pemahaman tentang bagaimana pemberian SH-MSC mempengaruhi ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ , yang pada gilirannya membantu memperbaiki *alopecia*.

1.4.2 Praktis

Temuan riset ini diperkirakan akan mendukung penerapan gel SH-MSCs topikal guna mengobati *alopecia*

1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1. Originalitas penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Thompson III GR, Krois CR, Affolter VK, Everett AD, Katarina Varjonen E, Sharon VR, <i>et al</i> ¹⁵	Pemeriksaan pada Model Kohort Hewan dan Manusia dengan <i>Alopecia</i> yang diinduksi <i>Fluconazole</i> .	Eksperi mental <i>in vivo</i>	Pemberian <i>fluconazole</i> harian di hari ke 7 meningkatkan fase telogen efluvium
Yanqiao Li <i>et al</i> . ¹⁶	Sekresi Eksosom dari Sel Punca Adiposa (ADSC-Exos) sebagai Terapi Alternatif <i>Alopecia</i> yang Dimediasi Imun	Eksperi mental <i>in vitro</i>	Terapi ADSC-Exos meningkatkan pertumbuhan kembali rambut dengan regulasi jalur pensinyalan miR-22, Wnt / β -catenin, dan TNF- α pada <i>alopecia</i> yang dimediasi imun.
Dong Ho Bak <i>et al</i> . ¹⁷	Peran Ekspresi Faktor Pertumbuhan oleh Sel Punca Mesenkimal Darah Tali Pusat Manusia yang Direkayasa (hUCB-MSC) Dalam Pertumbuhan Rambut	Eksperi mental <i>in vitro</i>	HUCB-MSCs meningkatkan kelangsungan hidup dan protein untuk induksi rambut secara <i>in vitro</i> . hUCB-MSC menginduksi faktor pertumbuhan rambut seperti <i>Insulin-like growth factor binding protein-1</i> (IGFBP-1) dan <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) Secara keseluruhan, hUCB-MSC meningkatkan pertumbuhan rambut melalui mekanisme parakrin.
Olayinka J (Jadé) <i>et al</i> . ¹⁸	Immunopatogenesis pada <i>alopecia areata</i> Vol. 2, Riset terbaru dalam Imunologi	Eksperi mental <i>in vivo</i>	Akumulasi granula sitotoksik menghancurkan sel folikel rambut dan mengganggu siklus pertumbuhan rambut
Kuntardjo Novalia <i>et al</i> . ¹⁹	MSC-CM yang diaktivasi TNF- α gel Topikal Efektif dalam	Eksperi mental <i>in vivo</i>	Pemberian MSC-CM secara topikal lebih efektif dibandingkan kombinasi topikal injeksi subkutan

meningkatkan level
PDGF, Densitas
Fibroblas dan
Penyembuhan Luka
dibandingkan
Kombinasi Injeksi
Subkutan

Berdasarkan penelitian terdahulu didapatkan bahwa pemberian injeksi sel punca mesenkimal dapat menghambat respon peradangan melalui jalur pensinyalan jalur pensinyalan miR-22, Wnt / β -catenin. Pada penelitian Olayinka J (Jadé) *et al* juga ditelaah penghambatan IL-15 sebagai kemungkinan baru untuk menghambat *alopecia areata*, namun belum ada penelitian pemberian SH-MSCs terhadap penurunan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada model tikus galur *Wistar* dengan *alopecia like* diinduksi *fluconazole* per oral. Pemilihan dosis gel topikal SH-MSCs menggunakan dasar penelitian Kuntarjo Novalia dimana didapatkan krim topikal S-CM dosis 100 μ L/kgBB dan 200 μ L/kgBB dapat mempercepat wound healing pada tikus wistar dibandingkan injeksi. Konsentrasi gel topikal SH-MSCs 10 dan 20% didapatkan dari dosis 20 μ L dan 40 μ L (estimasi berat tikus wistar jantan 200 gr) yang dilarutkan dalam total 200 mg gel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Interleukin - 15 pada *alopecia areata*

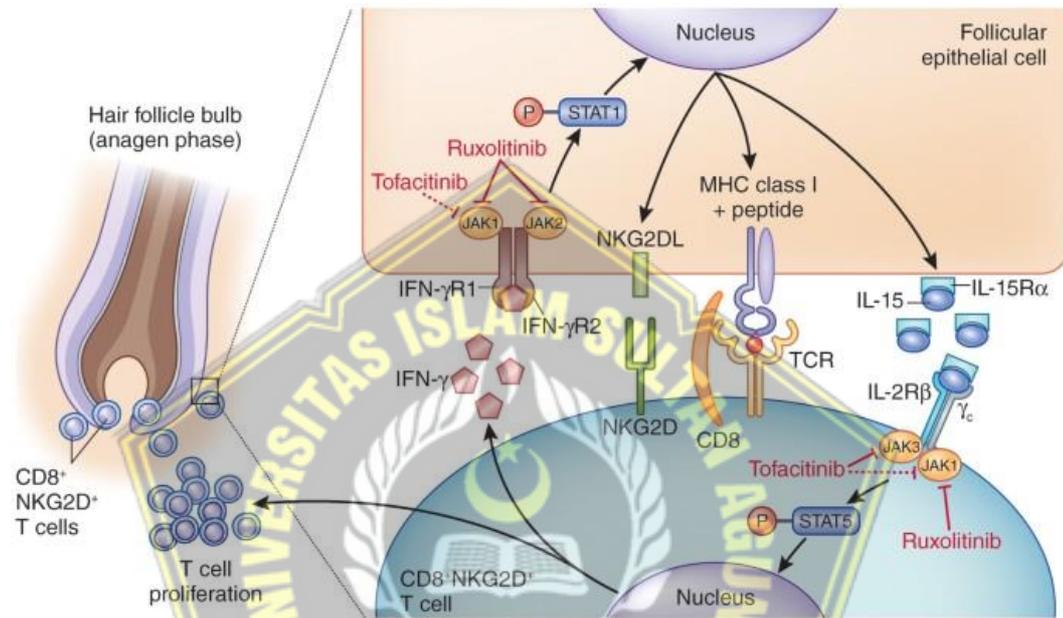
Interleukin-15 (IL-15) merupakan biomarker *alopecia* yang didapatkan nilainya lebih tinggi pada individu dengan *alopecia areata*. Level IL-15 tidak dipengaruhi oleh aktivitas maupun durasi penyakit namun oleh tipe *alopecia* yang diderita.²⁰

IL-15 memiliki efek multipel pada sel yang berbeda. Sistem imun bawaan dan didapat dapat dipengaruhi oleh IL-15. Pada *alopecia areata*, reseptor IL-15 dan IL-15R β meningkat dan mempengaruhi folikel rambut.^{20,21}

Diketahui dengan jelas bahwa perkembangan limfosit ditingkatkan oleh kerja IL-15 yang memiliki peran dalam penyakit autoimun seperti artritis reumatoid dan sklerosis multipel yang memiliki etiologi autoimun.^{20,21} IL-15 diketahui menginduksi pembentukan sitokin tertentu yang berperan dalam penyakit autoimun.²⁰

Eksresi gen dari sitokin γ c dan reseptornya termasuk transkrip untuk IL-15 diidentifikasi pada lesi kulit *alopecia areata* pada manusia dan tikus. Selain itu, deteksi imunofluoresensi IL-15 dan reseptor IL-15 α uniknya menunjukkan upregulasinya pada folikel rambut *alopecia areata* dan ekspresi IL-15R β pada sel T CD8+ infiltrasi manusia. Pemberian antibodi IL-15R secara sistemik melalui rute intraperitoneal menghambat perkembangan *alopecia areata*. Ditemukan bahwa IL-15 dapat diekspresikan oleh keratinosit yang mengalami stres atau oleh sel imun yang teraktivasi. Selain itu, IL-15 pada *alopecia areata* terbukti membatasi

penghambatan kapasitas sel T-regulatory dan dapat menjadi primadona mengistirahatkan sel NK untuk membunuh dengan mempromosikan ekspresi NKG2D yang dianggap sebagai kunci untuk peningkatan patogenesis *alopecia areata*.²¹



Gambar 2.1 Penghambatan janus kinase pada *alopecia*²²

2.2 Interferon gamma IFN- γ pada Alopecia Areata

Sitokin dan komponen kimiawi lainnya yang mengatur siklus rambut memainkan peran penting dalam perkembangan etiologi *alopecia like*. Telah dikenal secara luas, bahwa TNF- α berperan penting dalam etiologi *alopecia like*. TNF- α dan sitokin lainnya terbentuk di keratinosit epidermis dan merupakan inhibitor pertumbuhan rambut yang adekuat.²³

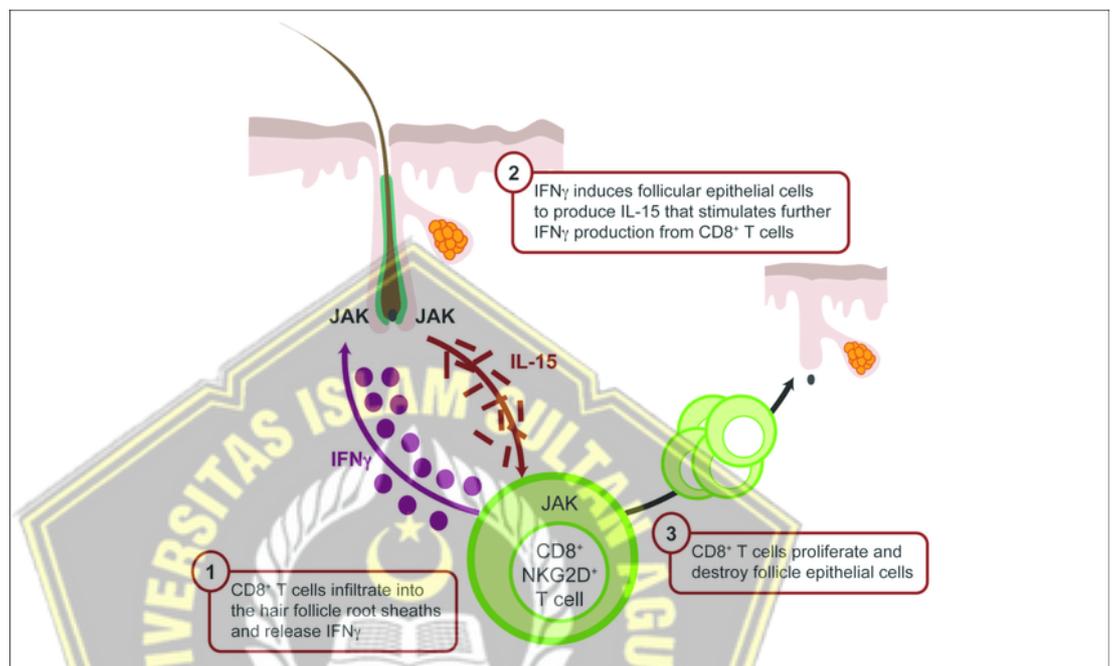
Sel T sitotoksik CD8+NKG2D+ dan interferon- γ (IFN- γ) telah terbukti memainkan peran penting dalam perkembangan AA. Sel T CD8+NKG2D+ menginfiltrasi folikel rambut AA, menginisiasi respons IFN γ dan meningkatkan

regulasi sitokin rantai- γ (γc), terutama IL-2 dan IL-15. Respon imun ini mengganggu pemeliharaan IP HF dengan menginduksi ekspresi ektopik molekul MHC dan ligan NKG2D di HF dan mempromosikan aktivasi dan kelangsungan hidup sel T CD8 + NKG2D +. Secara bersamaan, beberapa jalur imun juga bertanggung jawab atas autoreaktivitas pada AA, IFN- γ telah terlibat dalam pengembangan AA, menjadi sitokin efektor Th1 yang kritis dalam patogenesis AA. Ini terutama diproduksi oleh sel NK dan natural killer T (NKT). Pada fase anagen hair bulb, IFN- γ secara khusus mendorong respons imun dengan meningkatkan ekspresi MHC I, reseptor NKG2D, dan ligan kemokin (motif C-X-C) (CXCLs) di folikel rambut.²⁴

Autoreaktivitas umpan balik positif dari sel penghasil IFN- γ mempertahankan infiltrasi limfositik dan menginduksi aktivitas Th1, diikuti dengan peningkatan durasi dan perkembangan AA. PCR *reverse-transcriptase* semikuantitatif (RT-PCR) mengungkapkan bahwa IFN- γ mRNA meningkat secara signifikan pada kulit AA dibandingkan pada kulit normal. Sitokin ini menghambat pensinyalan sitokin 3, pengatur kuat pensinyalan sitokin, menekan AA dengan menghambat sel T CD8+ dari memproduksi IFN- γ . Kadar serum IFN- γ juga berkorelasi positif dengan tingkat peradangan dan keparahan AA. Semua bukti menunjukkan bahwa bahkan IFN- γ saja dapat menyebabkan keruntuhan IP HF.²⁴

IFN- γ juga menghambat jalur Janus kinase (JAK)/transduser sinyal dan aktivator transkripsi (STAT). Hal ini menghambat angiogenesis dan proliferasi dan aktivasi sel punca pada foliker rambut, yang mengakibatkan *alopecia*. Sebuah studi in vitro menggunakan kultur sel selubung kulit dari tikus C3H/HeJ menunjukkan bahwa

IFN- γ eksogen meningkatkan aktivasi STAT1. Hal ini juga menunjukkan bahwa IFN- γ dapat memengaruhi pensinyalan JAK/STAT untuk mengakhiri fase anagen sebelum waktunya di folikel rambut.²⁴



Gambar 2.2 IFN- γ Pada Folikel Rambut²²

2.3 Pemeriksaan Interleukin-15 dan IFN- γ

Pemeriksaan dilakukan dengan menilai kadar IL-15 dan IFN- γ pada serum menggunakan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).²⁰

Pada penelitian sebelumnya pengukuran IL-15 serum dilakukan dengan cara pengumpulan lima ml darah vena. Serum dibiarkan menggumpal selama 30 menit menggunakan tabung pemisah serum sebelum sentrifugasi selama 15 menit dan disimpan pada suhu -80 ° C sampai sampel diuji. Kadar serum IL-15 diukur dengan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).²¹

2.4 Alopecia Areata

Alopecia areata merupakan suatu kondisi kerontokan rambut yang reversible dan umum terjadi. Umumnya *alopecia areata* terlihat sebagai suatu area dengan kerontokan total rambut pada kulit kepala dan bagian tubuh lainnya yang dapat menimbulkan kerontokan total seluruh rambut tubuh.²³ Pria dan wanita memiliki kesempatan yang sama, beberapa data mengungkapkan bahwa laki-laki memiliki kesempatan untuk diagnosis dini dibandingkan dengan perempuan di masa remaja dengan asosiasi keterlibatan kuku dan penyakit autoimun. Prevalensi penyakit berkisar antara 0,1% sampai 0,2% di seluruh dunia.²⁰

Alopecia areata adalah kelainan autoimun yang ditandai dengan kerontokan rambut sementara, tanpa jaringan parut (*non-scarring*). Kerontokan rambut dapat terjadi dalam berbagai bentuk mulai dari kerontokan pada area tertentu hingga kerontokan rambut yang menyebar/ total. *Patchy alopecia* merupakan jenis yang paling umum. *Alopecia areata* mempengaruhi hampir 2% dari populasi umum. Studi genetik pada populasi umum dan model tikus menunjukkan bahwa *alopecia like* adalah penyakit poligenik yang kompleks. Beberapa lokus kerentanan genetik diidentifikasi terkait dengan jalur pensinyalan yang penting untuk siklus dan perkembangan folikel rambut.²⁵

Telah diketahui bahwa riwayat keluarga mempengaruhi hingga 40% penderita *alopecia*. Didapatkan bahwa genetik berperan dalam penyakit ini. Alel HLA kelas I berperan dalam penyakit ini, dan alel kelas 2 memiliki peran yang lebih signifikan. Namun HLA saja tidak dapat menjelaskan secara lengkap dasar genetik dari *alopecia like*.²³

Penyakit kerontokan rambut primer terbagi menjadi beberapa kelompok, yaitu *non-scarring alopecia*, *scarring alopecia* dan penyakit rambut terkait genetik. *Non-scarring alopecia* juga dikenal sebagai *alopecia* non-sikatrikal merupakan suatu kondisi kerontokan rambut akibat perubahan siklus rambut, perubahan ukuran folikel rambut, kerusakan rambut atau kombinasi dari hal tersebut dengan preservasi folikel rambut. Kerontokan rambut tipe ini terdiri dari beberapa bentuk yaitu :²⁵

1. *Alopecia* androgenik (*male pattern hair loss*)
2. *Female pattern hair loss*
3. Telogen effluvium
4. Trikotilomania
5. Tinea kapitis
6. *Short anagen syndrome*
7. *Loose anagen syndrome*
8. *Alopecia* triangular temporal

Scarring alopecia atau *alopecia* sikatrikal merupakan suatu kondisi kerontokan rambut dengan kerusakan folikel rambut akibat inflamasi, atau terkadang keganasan. Kerontokan rambut tipe ini dapat berupa :²⁵

1. *lichen planopilaris*
2. *Frontal fibrosing alopecia*
3. Lupus eritematosus kulit kronis
4. *Alopecia* sentrifugal sikatrikal sentral
5. *Folliculitis decalvans*

Beberapa penyebab dari *alopecia like* sudah diajukan, seperti infeksi, hipotesis troponerotik, keracunan talium asetat, penyakit tiroid, dan fluktuasi hormonal. Peradangan folikel rambut pada *alopecia like* yang dimediasi oleh leukosit sudah dijelaskan sejak beberapa abad yang lalu, sedangkan keterlibatan sistem imun dalam patogenesis primer *alopecia areata* baru diketahui sejak akhir tahun 1950an. *Alopecia areata* terkait dengan beberapa penyakit komorbid seperti depresi, kecemasan, autoimun, lupus, vitiligo, psoriasis, artritis reumatoid, dan *inflammatory bowel disease*. Penyakit atopi seperti sinusitis, asma, rinitis, dan dermatitis atopi, lebih sering ditemukan pada populasi dengan *alopecia like*.²⁵

Pada kondisi normal, rambut pada umumnya berada pada fase anagen. Fase awal dari *alopecia like* adalah proses cepat folikel rambut dari fase anagen, katagen, menuju fase telogen folikel yang kurang terpengaruhi tetap pada fase anagen, tapi menyebabkan batang rambut distrofik yang berikutnya berkembang ke fase telogen.²⁵

Exclamation point hair (sejenis rambut distrofi) adalah karakteristik utama *alopecia like* dan biasanya tidak terlihat pada orang yang sehat. Meskipun *exclamation point hair* mungkin memiliki akar yang terbentuk dengan baik yang identik dengan rambut telogen normal, akarnya sering kali menyempit dan rambut lebih mudah rontok dari biasanya. Perubahan ini menunjukkan penahanan rambut yang rusak di dalam folikel.²⁵

Peradangan peribulbar umumnya ditemukan di sekitar folikel anagen yang berdekatan dengan lesi fokal. Folikel yang terkena masuk kembali ke fase anagen. Lesi awal menunjukkan pengurangan ukuran folikel di bawah tingkat kelenjar

sebaceous, dengan pelestarian bagian di atas kelenjar sebaceous dan kelenjar itu sendiri. Folikel anagen yang lebih kecil aktif secara mitosis, menghasilkan selubung akar dalam yang normal. Korteks batang rambut tidak terkeratinisasi secara sempurna. Perubahan ini menunjukkan penghentian perkembangan folikel rambut terjadi pada fase anagen IV.²⁵

Selain faktor genetik, banyak faktor lain yang berperan dalam *alopecia* salah satunya faktor lingkungan. Namun stimulus lingkungan spesifik yang menimbulkan *alopecia* ini masih belum diketahui. Stress emosional juga memiliki peranan dalam perkembangan *alopecia like*. Psikotrauma akut, pengalaman yang menimbulkan stress dan situasi keluarga yang tidak diinginkan juga dihubungkan dengan permulaan *alopecia*. Pasien dengan *alopecia* memiliki kemungkinan yang lebih besar untuk mengalami masalah mental tertentu seperti depresi berat, masalah kecemasan, fobia sosial, atau penyakit paranoid. Pelepasan neuropeptida yang diinduksi oleh stress terjadi di kulit. Peningkatan substansi-P ditemukan disekitar area folikel rambut yang rusak pada pasien *alopecia like*. *Alopecia like* diyakini disebabkan oleh fitur imunomodulator substansi-P, termasuk granulasi sel mast, aktivasi sitokin dan kemokin pro-inflamasi.²³

Infeksi juga diduga dapat menjadi etiologi dari *alopecia like*, tapi belum ada agen mikroba persisten yang ditemukan pada pasien *alopecia like*. Boni et al menemukan adanya peningkatan prevalensi *helicobacter pylori* pada pasien *alopecia like*.²³

Patogenesis autoimun pada *alopecia like* adalah melalui kerusakan folikel rambut oleh sel inflamasi ataupun melalui kehilangan privilege imun dari folikel

rambut yang menyebabkan kerusakan rambut oleh sistem imun. Kerusakan folikel rambut oleh sel inflamasi secara spesifik oleh sel T sitotoksik melalui produksi interferon gamma yang mengaktifasi interleukin 2, 7, 15 dan 21. Berikutnya sitokin ini mensinyali transduser Janus Kinase dan aktivator transkripsi.²⁰

Gambaran klinis dari *alopecia areata* ditandai dengan adanya area sirkular atau oval yang mengalami kerontokan *non-scarring* diikuti dengan periode remisi spontan dan periode eksaserbasi. Area yang jelas dapat memiliki warna merah muda dan memiliki *exclamation point shaped hair* di area perbatasannya. *Exclamation point shaped-hair* merupakan rambut yang pendek, rusak dengan porsi distal yang lebih lebar daripada segmen proksimalnya. Kulit yang terkena biasanya menjadi lembut, dan hampir tidak memiliki rambut sama sekali. Area yang dapat terkena biasanya adalah rambut tubuh, alis, bulu mata, janggut, ketiak, pubis dan seluruh tubuh juga dapat mengalami *alopecia*. Dari semua tempat, kulit kepala merupakan area tersering mengalami *alopecia like* mencapai 90%. Sebelum terjadi kerontokan rambut, beberapa orang dapat merasakan gatal, perasaan terbakar, atau rasa tidak nyaman, namun hal ini tidak umum terjadi. Pada kondisi aktif, saat patch *alopecia* berkembang, *hair pull test* yang positif dapat ditemukan di pinggiran lesi. Abnormalitas kuku merupakan gambaran klinis lainnya yang dapat mengawali atau mengikuti perkembangan penyakit, dan biasanya dapat kembali spontan atau bertahan lama setelah restorasi rambut komplit.²³



Gambar 2.3 *Alopecia Areata* Tipe Retikularis²³



Gambar 2.4 *Alopecia Areata* Tipe Sisiapho²³



Gambar 2.5 *Alopecia Areata* Tipe Ophiasis²³



Gambar 2.6 Alopecia Areata tipe Difus²³

Setiap tipe *alopecia areata* dapat muncul pada usia berapapun, namun kelompok *alopecia areata patchy* memiliki proporsi usia kecil dari 20 tahun mencapai 50% penderita. Kelompok ini memiliki respon terapi yang baik dibandingkan dengan kelompok *alopecia areata* tipe lainnya.²³

Secara morfologis tipe *patchy* memiliki gambaran bulat atau oval. Tipe ophias memiliki pola seperti pita, dengan *alopecia* yang meluas sepanjang area oksipital posterior dan batas kulit kepala temporal. Tipe sisiapho memiliki gambaran yang berbanding terbalik dari tipe ophias yaitu dengan rambut sentral yang hilang memisah pada pinggir kulit kepala.²³

Presentasi klasik *alopecia areata* adalah serangan tiba-tiba pola bercak botak menyeluruh dengan peningkatan kerontokan rambut. Fitur dermatoskopi termasuk titik kuning dan *exclamation mark hair* (rambut patah pendek dengan ujung distal lebar terlihat di sepanjang tepi bercak yang merupakan penanda aktivitas penyakit). Sebagian besar penderita memiliki satu atau lebih bercak rambut rontok melingkar, meskipun rambut rontok yang luas atau komplit dapat terjadi (yaitu *alopecia totalis/universalis*). Kuku mungkin terlibat pada 10% pasien dengan pitting dan trachyonychia menjadi kelainan yang paling umum. Gambaran

histologi menunjukkan adanya infiltrasi sel-T di sekitar bulbar folikel rambut. Hal ini mengganggu pertumbuhan rambut dengan mengubah folikel rambut yang awalnya anagen menjadi katagen sehingga memicu kerontokan rambut. Siklus rambut berikutnya juga dapat dipengaruhi dengan folikel anagen yang dipaksa menjadi katagen sebelum batang rambut terbentuk sempurna. *Alopecia* seringkali mengalami kekambuhan, remisi dengan kecenderungan peningkatan rambut rontok yang luas dari waktu ke waktu.¹²

2.5 Telogen effluvium

Telogen effluvium adalah kelainan kulit kepala yang ditandai dengan kerontokan rambut yang menyebar dan tidak menimbulkan jaringan parut. Kondisi ini dibagi menjadi beberapa klasifikasi yaitu^{2,3}

a. Telogen effluvium akut

Kerontokan rambut yang berlangsung kurang dari enam bulan. Umumnya rambut rontok terjadi dua sampai tiga bulan setelah paparan pemicu. Pada sekitar 33% kasus, penyebabnya masih belum diketahui. Effluvium telogen akut biasanya mengalami remisi pada sekitar 95% kasus. Pada pemeriksaan tampak rambut frontal yang lebih pendek dan tumbuh kembali.

b. Telogen Efluvium Kronis

Kondisi berlangsung lebih dari enam bulan. Gangguan tersebut sebagian besar menyerang wanita paruh baya. Pemeriksaan kulit kepala menunjukkan rambut memiliki ketebalan normal dengan tanda-tanda rambut tumbuh kembali yang lebih pendek di daerah frontal dan bitemporal.

Telogen effluvium disebabkan oleh kelainan pada siklus rambut normal, yang

dipicu oleh banyak faktor. Dalam kondisi normal, folikel rambut memiliki siklus hidup tiga fase. Ini terdiri dari fase pertumbuhan (anagen), fase involuting (catagen), dan fase istirahat (telogen). Fase anagen dapat berlangsung sekitar dua hingga lima tahun, dan sekitar 90% rambut kulit kepala berada pada fase ini. Fase katagen adalah fase yang jauh lebih pendek, berlangsung tiga hingga enam minggu. Selama fase ini, folikel rambut mengalami proses kematian sel terprogram (apoptosis). Terakhir, fase telogen berlangsung sekitar tiga hingga lima bulan, dan 10% rambut kulit kepala berada di fase ini. Selama fase ini, batang rambut tumbuh menjadi rambut klub, yang akhirnya terlepas dari folikel. Jika persentase folikel kulit kepala yang ada pada fase telogen meningkat, hal ini menyebabkan kerontokan rambut yang berlebihan.

Mekanisme Pengelupasan, ada lima mekanisme dimana kerontokan rambut dapat terjadi pada telogen effluvium adalah sebagai berikut:^{2,3}

1. Pelepasan anagen segera: Hal ini disebabkan oleh penyebab yang mendasarinya. Folikel meninggalkan fase anagen dan memasuki fase telogen sebelum waktunya, menyebabkan peningkatan peluruhan dua sampai tiga bulan kemudian
2. Pelepasan anagen yang tertunda: Hal ini disebabkan perpanjangan fase anagen yang mengakibatkan pelepasan telogen yang berat.
3. Sindrom anagen pendek: Hal ini disebabkan oleh pemendekan fase anagen idiopatik, yang menyebabkan effluvium telogen persisten.
4. Pelepasan telogen segera: Hal ini disebabkan oleh pemendekan fase telogen,

yang mengakibatkan pelepasan rambut secara masif.

5. Pelepasan telogen yang tertunda: Hal ini disebabkan fase telogen yang berkepanjangan dan transisi yang tertunda ke fase anagen.

Ada berbagai faktor yang dapat memicu gangguan pada siklus rambut normal.

a. Narkoba

Banyak obat dapat menyebabkan kerontokan rambut telogen dan biasanya dimulai setelah 12 minggu pemberian dosis. Obat-obatan yang dapat menyebabkan telogen effluvium antara lain pil kontrasepsi oral, androgen, retinoid, beta-blocker, ACE (angiotensin-converting enzyme) inhibitor, antikonvulsan, antidepresan, dan antikoagulan (heparin).

b. Stres Fisiologis

Peningkatan stres fisiologis seperti trauma bedah, demam tinggi, penyakit sistemik kronis, dan perdarahan dapat menyebabkan telogen effluvium. Melahirkan juga bisa menyebabkan rambut berlebih memasuki fase telogen. Kerontokan rambut ini, telogen gravidarum, terjadi kira-kira tiga bulan setelah melahirkan.

c. Kondisi medis

Banyak gangguan medis dapat menyebabkan telogen effluvium. Hipertiroidisme dan hipotiroidisme dapat menyebabkan telogen effluvium, dan keadaan ini berbalik setelah keadaan eutiroid tercapai. Gangguan sistemik kronis seperti amiloidosis sistemik, gagal hati, gagal ginjal kronis, penyakit radang usus, dan gangguan limfoproliferatif juga dapat menyebabkan telogen effluvium.

d. Pemicu Diet

Defisiensi asam lemak esensial menyebabkan telogen effluvium, dan ini biasanya terjadi dua sampai empat bulan setelah asupan yang tidak mencukupi. Vitamin D sangat penting untuk pertumbuhan sel sehingga dikaitkan jika terjadi defisiensi maka bisa memicu telogen effluvium.

e. Sinar ultraviolet

Mikroskop elektron dari rambut yang terpapar sinar matahari mengungkapkan perubahan pada komponen seluler dan kerusakan pada kutikula dan korteks rambut. Kedua mekanisme ini dapat dikaitkan dengan peningkatan kerontokan rambut di telogen.

Obat minoxidil dan finasteride standar yang disetujui FDA saat ini bukanlah penghambat katagen yang efisien atau penginduksi anagen. Obat penginduksi katagen (misalnya, beta-blocker, retinoid, antikoagulan, obat antitiroid) harus dihindari, dan kelainan endokrin yang menginduksi katagen (misalnya, gangguan androgen, gangguan tiroid, kadar prolaktin abnormal) harus diobati.^{2,3}

2.6 Sekretom sel punca mesenkimal hipoksia

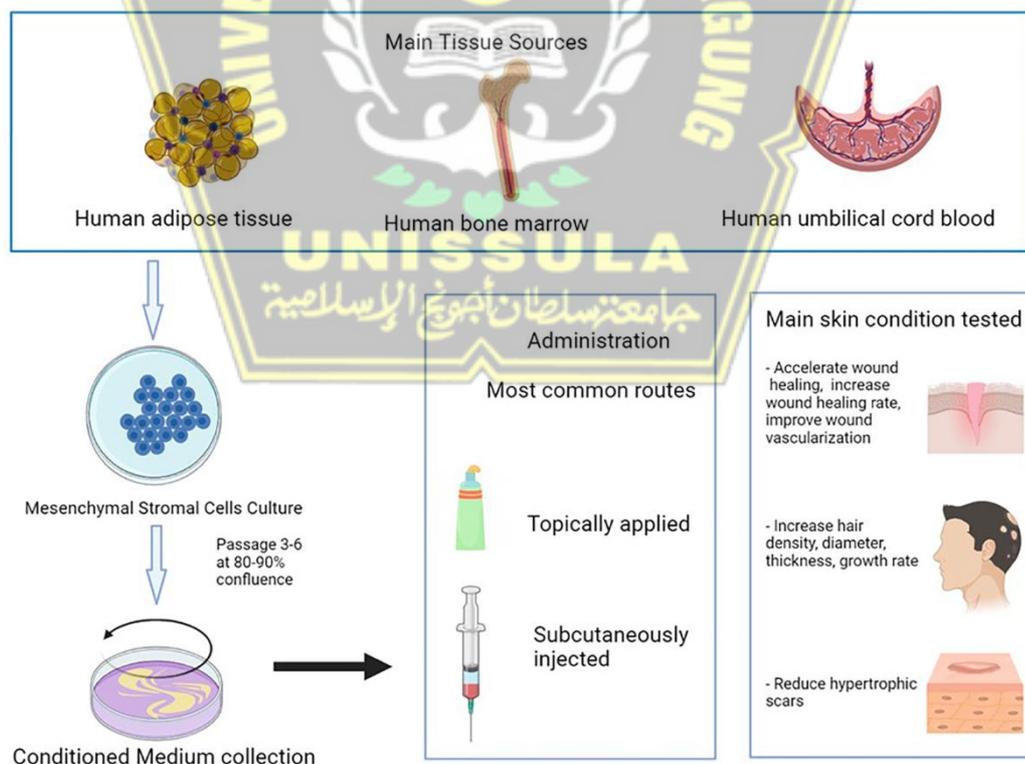
Kemampuan yang kuat untuk memodulasi respon imun dan inflamasi, *mesenchymal stem cells* (MSCs) muncul sebagai alat terapi berbasis sel yang prospektif untuk gangguan imun serta penyakit inflamasi.²⁶ Studi menunjukkan bahwa MSC dapat meringankan *acute lung injury* (ALI) dan ARDS tanpa efek samping yang parah. Efek terapeutik MSC sebagian besar disebabkan oleh sekresinya yang kaya akan faktor pertumbuhan, sitokin, vesikel ekstraseluler, dan eksosom.^{27,28} Selain itu, sekretome dari MSC dapat menimbulkan efek yang sama

atau bahkan efek yang lebih baik daripada MSC induknya. Media untuk MSCs (MSCs-CM) mengandung seluruh sekresi sel, dan telah dilaporkan dapat mengurangi inflamasi paru, meningkatkan pemulihan fungsional multiple sclerosis, dan mempercepat penyembuhan luka kulit.²⁹

Kuantitas sel yang cukup dan kualitas sel yang optimal adalah dua faktor penting yang terkait dengan kemanjuran MSC dalam imunoterapi berbasis sel. Penuaan seluler merupakan penyebab penting yang menghambat proliferasi sel dan menginduksi penurunan kualitas sel. Penuaan MSC tidak hanya dapat menurunkan kelangsungan hidup dan efisiensi ekspansi *in vitro*, tetapi juga dapat mengurangi kapasitas imunomodulator sehingga memengaruhi efektivitas terapi. Oksigen adalah elemen kunci untuk kelangsungan hidup dan pemeliharaan fungsional sel dalam jaringan. Studi menunjukkan bahwa pengobatan hipoksia jangka pendek (dikenal sebagai hipoksia prekondisi) berfungsi sebagai strategi yang efektif untuk meningkatkan kemampuan immunosupresif sehingga meningkatkan efek terapeutik MSC pada berbagai penyakit. Efek prekondisi hipoksia pada fungsi biologis MSC telah diteliti secara luas, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, fungsi parakrin, migrasi, dan pro-angiogenesis, dll.³⁰⁻³² MSC yang dibuat dalam kondisi hipoksia meningkatkan migrasi sel endotel vena umbilikal manusia dan mempromosikan pembentukan tabung sel endotel mikrovaskuler plasenta. Namun, *hypoxia preconditioning* yang dikerjakan kurang dari 48 jam telah dilaporkan menginduksi apoptosis MSC. Dampak hipoksia jangka panjang pada proliferasi MSC masih kontroversial.³³

Sifat MSC-CM bervariasi tergantung pada sumber sel.³⁴ Lebih dari 10

sumber MSC digunakan untuk merawat kondisi kulit. MSC dapat diisolasi dari jaringan adiposa, sumsum tulang, dan darah tali pusat manusia. Aspek penting lainnya adalah waktu pengumpulan media yang dikultur (CM) dari sel dan langkah konsentrasi yang dilakukan untuk mendapatkan CM. Sekresi sel juga dapat bervariasi tergantung pada usia sel. Selain itu, jenis sel yang sama dapat mengeluarkan tingkat faktor parakrin yang berbeda bergantung pada kondisi kultur (hipoksia vs. normoksik).³⁵ Perawatan hipoksia adalah salah satu cara yang paling sering digunakan untuk meningkatkan CM karena stres hipoksia mengurangi oksigen dan meningkatkan fungsi seluler. CM yang dikumpulkan dari MSC yang dikultur dalam kondisi hipoksia meningkatkan kapasitas proliferasi dan regenerasi sel.²⁶



Gambar 2.7 Sumber mesenchymal stromal cell yang dikultur dalam medium dan efek terhadap kulit.³⁶

2.7 Sel punca tali pusat

Sel induk adalah kandidat yang menarik untuk pengobatan berbagai macam penyakit karena sifatnya seperti pembelahan, regenerasi, diferensiasi, homing, dan engraftment. Sel induk mesenkimal tali pusat (UC-MSK) bisa menjadi pilihan terbaik jika mempertimbangkan potensinya yang tinggi untuk berdiferensiasi menjadi sel lain dan imunogenisitas yang rendah. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa pengobatan UC-MSK meningkatkan resistensi insulin pada pasien dengan T2DM. Namun, penggunaan terapeutik UC-MSK tidak mudah karena dapat terkumpul dalam organ penyaringan dan berpotensi menyebabkan tumor. Oleh karena UC-MSK sebagian besar bergantung pada aktivitas parakrin, CM yang terdiri dari faktor bioaktif dan sitokin dapat mengurangi efek tersebut.^{13,37}

2.8 Sinyal NF- κ B pada peradangan

Faktor transkripsi NF- κ B mengatur berbagai aspek fungsi imun bawaan dan adaptif dan berfungsi sebagai mediator penting dari respon inflamasi. NF- κ B menginduksi ekspresi berbagai gen pro-inflamasi, termasuk yang mengkode sitokin dan kemokin, dan juga berpartisipasi dalam regulasi peradangan. Selain itu, NF- κ B memainkan peran penting dalam mengatur kelangsungan hidup, aktivasi dan diferensiasi sel imun bawaan dan sel T inflamasi. Akibatnya, aktivasi NF- κ B yang tidak terderegulasi berkontribusi pada proses patogenik berbagai penyakit inflamasi. Sel imun bawaan, termasuk makrofag, sel dendritik, dan neutrofil memiliki peran penting terhadap kekebalan bawaan dan reaksi peradangan. Sel-sel ini mengekspresikan pattern recognition receptor (PRR) yang mendeteksi berbagai

komponen mikroba, yang disebut patogen associated molecular patterns (PAMPs). PRRs juga mengenali Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), yang merupakan molekul yang dilepaskan oleh sel nekrotik dan jaringan yang rusak.³⁹ Peristiwa pensinyalan umum dari PRR adalah aktivasi jalur NF- κ B kanonik, yang bertanggung jawab untuk induksi transkripsi sitokin proinflamasi, kemokin, dan mediator inflamasi tambahan dalam berbagai jenis sel imun bawaan. NF- κ B adalah faktor transkripsi kunci makrofag M1 dan diperlukan untuk induksi sejumlah besar gen inflamasi. IFN mengaktifkan tidak hanya jalur pensinyalan JAK/STAT tetapi juga jalur pensinyalan NF- κ B. NF- κ B mengatur ekspresi gen pengkode (mRNA) dan bukan pengkode (miRNA) serta respons seluler terhadap IFN.^{39,40}

Stresa tau adanya paparan zat kimia menjadi pemicu tersering terjadinya kerusakan pada folikel rambut. Beberapa jalur pensinyalan terlibat dalam proses kerusakan tersebut. Pertama, jalur pensinyalan Wnt/ β -Catenin dan Sonic Hedgehog (Shh) dimana terdapat interaksi dalam perkembangan folikel rambut dan aktivasi sel punca. Kedua, jalur pensinyalan Wnt/ β -Catenin dan Notch. Jalur ini juga berinteraksi untuk mengatur aktivasi sel induk folikel rambut³⁸ Ketiga, pensinyalan Wnt/ β -Catenin dan BMP: Jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin dan BMP memiliki hubungan antagonis dalam aktivasi sel induk folikel rambut. Pensinyalan Wnt menghambat pensinyalan BMP dengan menekan ekspresi ligan BMP dan mempromosikan ekspresi inhibisi BMP, memungkinkan aktivasi sel punca.^{39,40} Keempat, komunikasi silang dengan Jalur Pensinyalan Lain yaitu jalur pensinyalan yang terlibat dalam aktivasi sel induk folikel rambut, termasuk Wnt/ β -catenin, Shh, Notch, BMP, dan lainnya, sering menunjukkan komunikasi silang dan interaksi

pengaturan yang rumit. Misalnya, jalur pensinyalan Akt/mTOR, JAK-STAT, dan MAPK dapat memodulasi aktivitas jalur Wnt/ β -catenin atau berinteraksi dengan jalur lain untuk mengatur aktivasi sel punca dan pertumbuhan rambut.⁴³

2.9 IL-10 mediator anti peradangan

Sekresi sitokin pro-inflamasi mempengaruhi sekresi sitokin anti-inflamasi untuk menyeimbangkan pertahanan tubuh. Dalam keadaan ini, IL-10 akan diproduksi untuk melawan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α . Namun TNF- α seringkali menyebabkan aktivasi NF- κ B dengan sendirinya dan membentuk rangkaian umpan balik positif. Sel punca mesenkimal (MSC) telah menarik banyak perhatian karena efek imunomodulatornya. Banyak penelitian telah melaporkan bahwa potensi terapeutik MSC berasal dari efek parakrin dari molekul yang disekresikan. MSC secretome diketahui memiliki efek imunomodulator. Sifat regeneratif secretome juga berkontribusi pada perbaikan organ dengan kondisi patologis yang berhubungan dengan peradangan. Satu studi menunjukkan bahwa pemberian sekresi MSC embrio manusia secara signifikan meningkatkan kelangsungan hidup dan meningkatkan skor histopatologis model tikus dari sepsis. Ini meningkatkan IL-10 tanpa mempengaruhi IL-1 β dan TNF- α .⁴⁴

2.10 *Fluconazole Induced Alopecia*

Papas et al pertama kali mengidentifikasi terdapat hubungan antara *fluconazole* dan *alopecia*. Dispekulasikan oleh yang lainnya bahwa efek ini mungkin terkait dengan interaksi yang belum teridentifikasi antara *fluconazole* dan turunan asam retinoat yang menimbulkan gambaran “retinoid-like” berupa

kerontokan rambut, kering pada kulit dan membran mukosa, serta perubahan kuku yang diobservasi pada beberapa orang yang mendapatkan terapi *fluconazole*.⁴¹

Penelitian oleh Thompson et al mengenai pengaruh *fluconazole* terhadap *alopecia* dilakukan dengan melakukan pemberian *fluconazole* secara acak dengan dosis 35mg/kg/hari pada tikus wistar jantan dan tikus lainnya tidak mendapatkan *fluconazole*. Pada pemeriksaan ini didapatkan hasil bahwa *fluconazole* mencetuskan perubahan folikel rambut dan menyebabkan folikel rambut tersebut masuk pada fase istirahat prematur (telogen effluvium). Hasil ini didapatkan pada tikus yang mendapatkan *fluconazole* dibandingkan dengan tikus yang tidak mendapatkan *fluconazole* pada hari ke 21 pemeriksaan. Pemberian *fluconazole* ini menyebabkan hambatan pada CYP26A1.⁴¹

Pada hari ke-7 pemberian *fluconazole*, terlihat perbedaan yang signifikan. Kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan berupa pemberian *fluconazole* menunjukkan jumlah rambut yang berada pada fase telogen lebih banyak dari pada rambut pada kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan. Hasil yang sama juga ditemukan pada hari ke-14. Perbedaan pada hari 21, 28, 35, 42 tidak lagi signifikan secara signifikan disebabkan oleh progresivitas tidak terawatnya tikus meskipun siklus rambut normal.⁴¹

BAB III

KERANGKA TEORI , KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

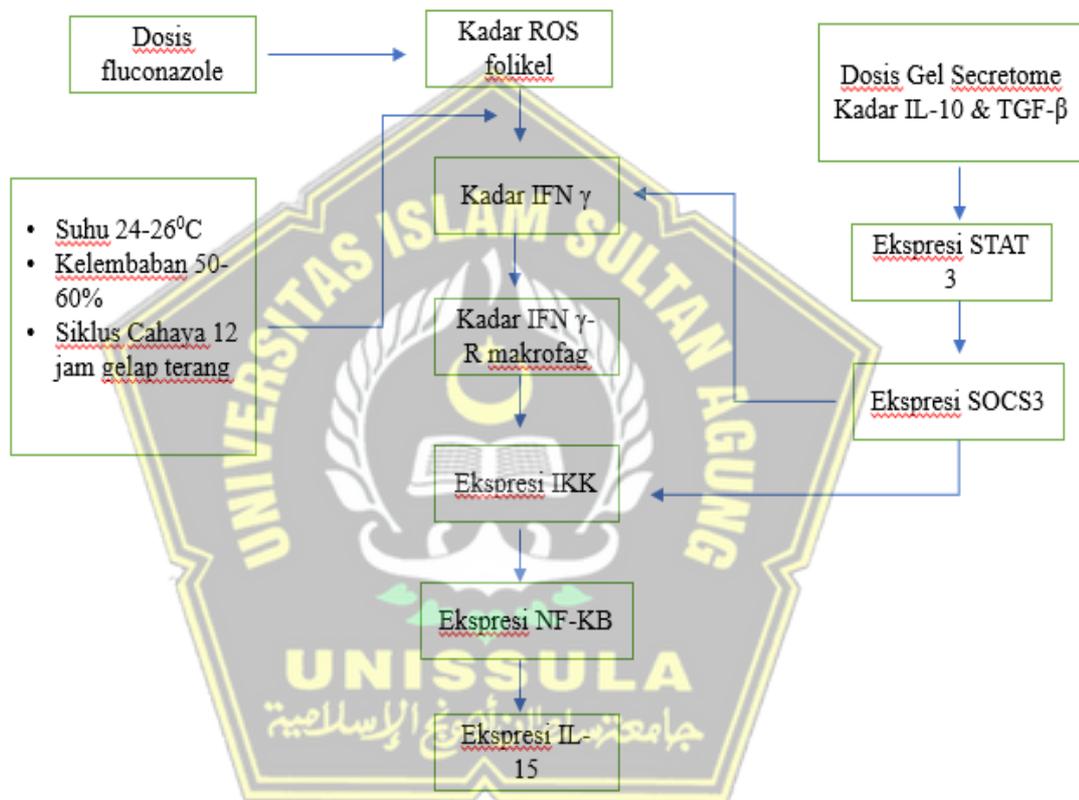
3.1 Kerangka Teori

Pemberian *fluconazole* akan mencetuskan radikal bebas termasuk pada folikel rambut, kadar IFN- γ yang menjadi respon peradangan meningkat. Sinyal yang diterima IFN R- γ pada makrofag memicu sinyal IKK kemudian NF- $\kappa\beta$ sebagai penanda inflamasi. Sel Th1 ditandai dengan sekresi IFN- γ , sebuah sitokin yang meningkatkan imunitas seluler dan berpartisipasi dalam proses inflamasi. NF- $\kappa\beta$ mempromosikan diferensiasi sel Th1 dengan mengatur pensinyalan *T-cell receptor* serta berfungsi dalam sel imun bawaan untuk memediasi induksi sitokin.

Aktivasi NF- $\kappa\beta$ melibatkan dua jalur pensinyalan utama, jalur kanonik dan nonkanonik (atau alternatif), keduanya penting untuk mengatur respons imun dan inflamasi meskipun ada perbedaan dalam mekanisme pensinyalan. Jalur kanonik NF- $\kappa\beta$ merespons berbagai rangsangan, termasuk ligan dari berbagai reseptor sitokin, reseptor pengenalan pola (PRR), anggota superfamili reseptor TNF (TNFR), serta *T-cell receptor* (TCR) dan reseptor sel-B. Mekanisme utama untuk aktivasi NF- $\kappa\beta$ kanonik adalah degradasi I κ B α yang dapat diinduksi yang dipicu melalui fosforilasi spesifik lokasinya oleh kompleks multi-subunit I κ B kinase (IKK)

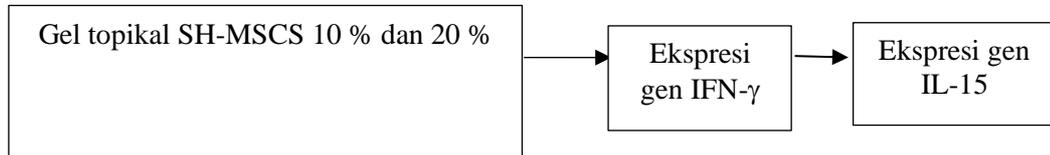
IL-10 yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan jalur STAT3 melalui translokasi JAK-1 dari membrane intraseluler menuju sitoplasma. Hal ini berdampak pada fosforilasi STAT3 dan translokasinya menuju nukleus. Translokasi STAT3 menuju nukleus dapat mengaktifasi gen SOCS3 untuk

selanjutnya disintesis menjadi protein yang dilepaskan menuju sitoplasma. Ekspresi SOCS3 pada sitoplasma menghambat jalur pensinyalan intraseluler IKK sehingga mencegah translokasi NF- κ B ke nukleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen pro-inflamasi. Melalui sintesis SOCS3 dan penghambatan NF- κ B, IL-10 dapat menekan ekspresi berbagai molekul pro-inflamasi, termasuk sitokin IFN- γ .³⁹⁻⁴¹



Bagan 3.1 Kerangka Teori

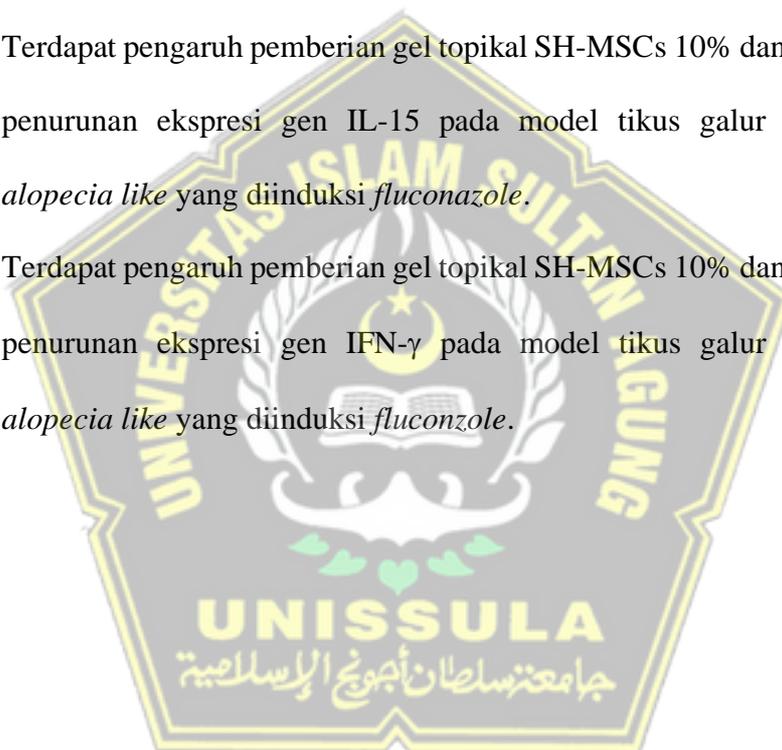
3.2 Kerangka Konsep



Bagan 3.2 Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% terhadap penurunan ekspresi gen IL-15 pada model tikus galur Wistar model *alopecia like* yang diinduksi *fluconazole*.
2. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% terhadap penurunan ekspresi gen IFN- γ pada model tikus galur Wistar model *alopecia like* yang diinduksi *fluconazole*.



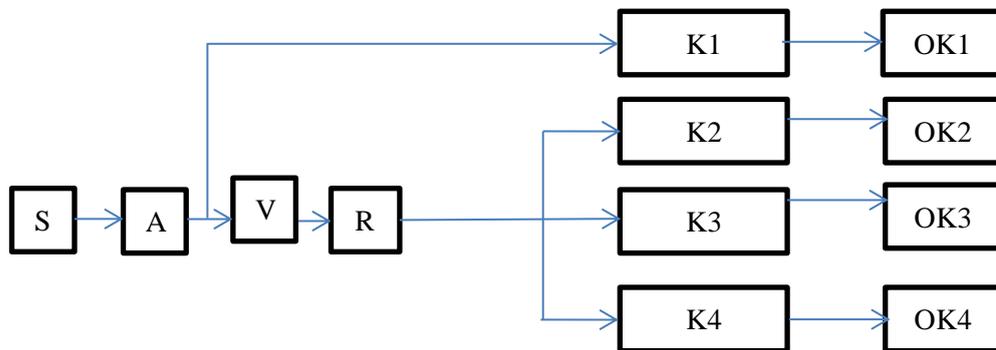
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Riset ini menerapkan desain eksperimen *in vivo* dengan kelompok kontrol *post-test only*.⁴ Riset ini memanfaatkan tikus *wistar* jantan dengan berat badan 200 gr \pm 10 gr (cv = 5%) sebagai subjek riset. Empat kelompok dipergunakan pada riset ini: dua kelompok perlakuan, satu kelompok tikus sebagai kontrol negatif, dan satu kelompok tikus sebagai kontrol sehat. Setelah intervensi maka dijalankan pengukuran data.

- S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat
- A : Adaptasi
- V : Validasi
- R : Randomisasi
- Kelompok 1 : K1: Tikus Sehat, dicukur
- Kelompok 2 : K2: Kontrol Negatif Tikus induksi *fluconazole* model *Alopecia Like* dengan 200 mg *base gel*.
- Kelompok 3 : K3: Tikus induksi *fluconazole* model *Alopecia Like* pemberian gel SH-MSCs 10% sebanyak 200 mg.
- Kelompok 4 : K4: Tikus induksi *fluconazole* model *Alopecia Like* pemberian gel SH-MSCs 20% sebanyak 200 mg.
- OK : Observasi Kelompok



Bagan 4.1 Skema Rancangan Penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada riset ini ialah gel topikal SH-MSCs dosis 20 μ l dan 40 μ l.

4.2.2.1. Variabel Antara

Variabel antara pada riset ini ialah ekspresi gen IFN- γ

4.2.2.3. Variabel Terikat

Variabel terikat pada riset ini ialah ekspresi gen IL-15

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. Gel Sekretom hipoksia MSCs (SH-MSCs)

Vesikel ekstraseluler dan molekul larut yang disekresikan oleh MSC ditemukan dalam gel SH-MSCs. Faktor pertumbuhan, kemokin, juga sitokin ialah contoh zat aktif biologis yang merupakan molekul larut. Sesudah mendapat

sekretom dari media prakondisi hipoksia MSC, Filtrasi Aliran Tangensial dipergunakan menyaring bahan.

Gel SH-MSCs diberikan pada konsentersasi 10% untuk K3 dan konsentersasi 20 % untuk K4 sebanyak 200 mg untuk tiap ekor tikus.

Skala: Ordinal

4.2.2.2. Ekspresi gen IL-15

Ekspresi IL 15 ialah jumlah gen IL 15 relative yang diekspresikan jaringan folikel rambut pada sampel penelitian, dianalisis menggunakan RT-PCR

Skala: Rasio

4.2.2.5. Ekspresi gen IFN- γ

Ekspresi IFN- γ ialah jumlah gen IFN- γ relative yang diekspresikan jaringan folikel rambut pada sampel penelitian, dianalisis menggunakan RT-PCR

Skala: Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Tikus *Wistar* jantan dengan berat badan 200 ± 10 gram dan berumur 2-3 bulan dijadikan sebagai subjek riset supaya disetujui dipergunakan pada riset ini.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklus sampel riset ialah tikus jantan putih galur *Wistar* berkriteria seperti:

1. Umur 8-12 minggu
2. Tikus kondisi *alopecia-like* setelah induksi *fluconazole* selama 14 hari, validasi fase telogen dengan pewarnaan HE dan pengamatan makroskopis rambut
3. Bobot badan 200 gr \pm 10

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* berkriteria:

1. Tikus yang sakit sebelum masa riset.

4.3.3.3. Kriteria Drop Out

Tikus yang mati selama penelitian.

4.4. Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

Riset ini menerapkan metode *Randomized Sampling* guna mengumpulkan sampel. Tikus *Wistar* jantan diberi empat perlakuan: perlakuan K1 (tanpa perlakuan), perlakuan K2 (hanya gel berbahan dasar air), perlakuan K3 (sepuluh persen dosis gel SH-MSCs), dan perlakuan K4 (dua puluh persen dosis SH-MSCs). Tikus pada setiap kelompok dilakukan pemeriksaan histopatologi sebelum dan setelah perlakuan. Induksi *fluconazole*.

4.5. Besar Sampel

Rumus sampel eksperimen Federer, yang mempunyai rumus sebagai berikut guna menentukan besarnya sampel yang dibutuhkan pada riset ini:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6 \rightarrow \text{Pembulatan menjadi } 6$$

Keterangan:

t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. Alat

Peralatan kultur sel, termasuk *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, peralatan bedah, dan labu 25T, dipergunakan pada saat ini. Ruang hipoksia dipergunakan menciptakan kondisi yang diperlukan untuk kultur hipoksia. Konsentrasi oksigen di ruang hipoksia diukur menggunakan pengukur oksigen. Selain itu, penyeka steril dipergunakan pada riset ini guna mengoleskan gel SH-MSD dan flukonazol dipergunakan dalam menginduksi gejala mirip *alopecia-like*. Instrumen guna menganalisis ekspresi gen IFN- γ dan IL-15.

4.6.2. Bahan

Bahan kultur yang dipergunakan pada riset ini antara lain tali pusar tikus, NaCl 0,9%, DMEM, FBS, PBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan alkohol 70%, PBS, Xylasine, ketamine, dan gel berbahan dasar air menjadi bahan yang dipergunakan dalam proses pengobatan.

4.7. Cara Penelitian

4.7.1 Perolehan Ethical Clearance

Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang memberikan izin etik untuk riset ini.

4.7.2 Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

Keseluruhan prosedur dijalankan di kabinet *biosafety* kelas 2 dengan teknik sterilitas tinggi dan peralatan steril.

1. Tali pusar janin tikus putus dan pembuluh darahnya dibuang.
2. Dengan memanfaatkan pinset, masukkan tali pusar ke dalam cawan petri dan gunakan PBS untuk membersihkannya secara menyeluruh.
3. Tali pusar dikumpulkan dan dimasukkan dalam wadah steril berisi NaCl 0,9%.
4. Tali pusar yang telah dicincang halus kemudian dituangkan secara merata ke dalam labu 25T dan didiamkan selama tiga menit agar tisu menempel pada permukaan flask.
5. Media lengkap (DMEM, penstrep, fungizone, juga FBS) ditambah sedikit demi sedikit hingga jaringan tertutup.

6. Dalam inkubator dengan suhu 37°C dan 5% CO₂, transplantasi tetap hidup.
7. Setelah prosedur kultur dimulai, sel akan terlihat setelah sekitar 14 hari.
8. Tiap tiga hari, media diganti dengan mengeluarkan setengahnya dan menambahkan medium penuh yang baru.
9. Pemeliharaan sel dijalankan sampai tercapai konfluensi 80%.

4.7.3 Proses Hipoksia

- 4.7.3.1 Setelah MSC mencapai konfluensi 80%, ditambahkan 10 mL media komplet.
- 4.7.3.2 Setelah itu, flask yang mengandung MSC ke dalam ruang hipoksia.
- 4.7.3.3 Konsentrasi oksigen dalam *chamber* diukur dengan menempatkan oksigen meter pada lubang sensor dan menyalurkan gas nitrogen melalui katup inlet.
- 4.7.3.4 Sampai oksigen 5% ditunjukkan oleh jarum indikator, nitrogen ditambahkan.
- 4.7.3.5 Ruang yang berisi flask diinkubasi pada suhu 37°C selama sehari penuh. Setelah periode 24 jam, media kultur dikeluarkan dan SH-MSC diperoleh dengan menyaringnya dengan TFF. Gel tersebut kemudian dicampur dengan K3 dan K4 dengan dosis yang sesuai.

4.7.4 Pembuatan Sediaan Gel

- 4.7.4.1 Banyak gel yang diperlukan untuk satu kali pengolesan pada dorsal

tikus dengan luas 2 cm x 2 cm membutuhkan 200 mg gel.

Pada penelitian ini, SH-MSCs 1 uL = setara dengan 1 mg karena 1 uL SH-MSCs dilarutkan dalam 1 mg NaCl.

Mengikuti penelitian terdahulu, penggunaan gel topikal SH-MSCs 100 μ L dan 200 μ L/kgBB pada tikus wistar jantan berat 200 gr, maka didapatkan dosis 20 uL dan 40 uL untuk masing-masing K3 dan K4.

Pembuatan sediaan gel SH-MSCs untuk K3 dilakukan dengan mencampurkan 20 mg larutan SH-MSCs ditambah 20 mg NaCl dan 160 mg basis gel untuk mendapatkan total 200 mg gel dengan konsentrasi 10%.

Pembuatan sediaan gel SH-MSCs untuk K4 dilakukan dengan mencampurkan 40 mg larutan SH-MSCs ditambah 160 mg basis gel untuk mendapatkan total 200 mg gel dengan konsentrasi 20%.

4.7.4.2 Kondisi aseptik dijaga selama pengadukan agar tercipta campuran homogen yang sesuai dengan sifat fisik yang terlihat di bawah mikroskop.

4.7.5 Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek

Percobaan

4.7.5.1 Setelah adaptasi dalam seminggu, tikus diberi kombinasi xylazine 20 mg/kgbb dan ketamine 60 mg/kgbb guna menginduksi anestesi.

4.7.5.2 Rambut punggung tikus dirapikan hingga bersih.

4.7.5.3 Hewan disonde dengan *fluconazole* 35 mg/kgBB per oral selama 14

hari.

4.7.5.4 Dilakukan validasi secara makroskopis dengan mengukur panjang rambut dan mikroskopis menggunakan Hematoksin Eosin untuk menganalisis folikel rambut.

4.7.5.5 Selanjutnya dalam waktu tujuh hari diberikan gel SH-MSCs topikal 200 mg/mencit/hari dengan kandungan 10% (K3) dan 20% (K4) SH-MSCs. Gel dasar diberikan pada tikus kontrol negatif.

4.7.5.5 Guna membuat sediaan histologi dengan teknik parafin juga pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE), diperoleh sampel kulit dari tiap-tiap kelompok.

- Sampel kulit tikus diambil pada tiap kelompok juga diawetkan pada larutan NBF 10%.
- Sampel kulit dibersihkan dari sisa larutan fiksatif dengan membilasnya memakai alkohol 70%.
- Guna memulai proses dehidrasi, sampel kulit direndam dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan absolut masing-masing dalam waktu 30 menit.
- Selama satu jam, sampel kulit direndam dalam toluol hingga menjadi bening atau transparan.
- Proses infiltrasi ke parafin dijalankan dengan memanaskan sampel kulit di suhu 56–60°C dalam oven dan merendamnya selama 30 menit dalam larutan yang mengandung toluol dan parafin dengan perbandingan sebagai berikut: 3:1, 1:1, dan 1:

3. Selama tiga puluh menit, sampel kulit diberi perlakuan parafin murni I, parafin murni II, juga parafin murni III.

- Penanaman: Sampel kulit parafin murni dimasukkan ke dalam cetakan blok parafin berisikan parafin cair, kemudian parafin dibiarkan mengeras.
- Dengan memakai mikrotom, sampel kulit yang diawetkan dalam blok parafin dipotong menjadi irisan dengan ketebalan 6 μm .
- Setelah direndam dengan sedikit aquades dan diberi albumin Mayer, potongan sampel jaringan ditempelkan pada kaca objek dengan cara dipanaskan di atas *hot plate* hingga menempel sempurna.
- Guna mende-parafinisasi sediaan histologis, rendam dalam xylol selama sehari penuh.
- Pewarna Histoxylin-Eosin dipergunakan sebagai pewarnaan. Kertas saring dipergunakan untuk menyerap kandungan xylol, kemudian ditambah alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30% satu per satu selama satu hingga dua menit dan air sulingan. Setelah direndam dalam pewarna hematoksilin selama lima sampai sepuluh detik, sediaan dibilas selama sepuluh menit dengan air mengalir. Sediaan kemudian dicelupkan ke dalam alkohol dengan jumlah berbeda (30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%) masing-masing selama tiga sampai

lima menit. Setelah dimasukkan ke dalam eosin selama lima sampai sepuluh menit, sediaan dicelupkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96% masing-masing selama tiga sampai lima menit, kemudian dikeringkan dengan kertas saring. Setelah sediaan dimasukkan ke dalam xylol selama lima belas menit, balsam Kanada diteteskan ke sediaan histologis.

- Sediaan diberi label, dimasukkan ke dalam kotak sediaan, dan ditutup dengan kaca penutup.

4.7.6 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

4.7.6.1 100 mg sampel kulit dipotong kecil-kecil lalu dimasukkan dalam tabung berisi 50 mL RNA Iso Plus. Sebaliknya, 50 mL RNA Iso Plus ditambahkan ke PBMC yang masing-masing berisi 10^7 sel, setelah ditempatkan dalam tabung mikro. Setelah potongan kulit digiling dengan pasta mikro, ditambahkan 50 mL RNA Iso Plus dan didiamkan pada suhu kamar selama lima menit. Setelah ditambahkan 20 mL kloroform, aduk campuran tersebut hingga berubah warna menjadi putih pucat.

4.7.6.2 Setelah diinkubasi selama dua sampai tiga menit pada suhu kamar, campuran disentrifugasi selama lima belas menit pada suhu 40°C dengan kecepatan 15.000 rpm, atau hingga muncul tiga lapisan di dalam tabung. RNA (fase cair) membentuk lapisan atas, DNA (fase semipadat) membentuk lapisan kedua, dan sisa-sisa sel membentuk lapisan bawah.

- 4.7.6.3 Setelah lapisan atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru, volumenya ditentukan dan isopropanol ditambahkan dalam jumlah yang sama dengan RNA yang diekstraksi darinya.
- 4.7.6.4 Setelah tabung Eppendorf dikocok hingga mulai terlihat benang putih, disentrifugasi selama sepuluh menit pada suhu 40⁰C dengan kecepatan 15.000 rpm. Sampai pelet putih terlihat di dasar tabung, supernatan dibuang.
- 4.7.6.5 Setelah pengeringan, ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan DEPC (Diethyl pyrocarbonate). Campuran kemudian diputar terus menerus dan disentrifugasi sekali lagi selama lima menit pada suhu 40⁰C dengan kecepatan 15.000 rpm.
- 4.7.6.6 Setelah supernatan dibuang, DEPC 30–50 μ m ditambahkan. Selama sepuluh menit, campuran diinkubasi pada suhu 55⁰C. Selanjutnya, seluruh larutan RNA diperoleh dan diawetkan pada suhu -80⁰C. Nanodrop dipergunakan untuk kuantifikasi RNA. 3000 ng adalah hasil penghitungan kuantifikasi.
- 4.7.6.7 Sintesis cDNA dilakukan dengan membuat campuran A yang terdiri dari sampel RNA yang dihitung, 1 μ L OligoDT, dan air PCR. Campuran kemudian dibawa ke volume 10 μ L dan diinkubasi pada suhu 70⁰C selama 5 menit.
- 4.7.6.8 Campuran B, yang berisi 4 μ L buffer 5X, 5 μ L H₂O yang diberi perlakuan DEPC, dan 1 μ L ReverTraAce, ditambahkan ke dalam campuran A. Campuran diinkubasi selama lima menit pada suhu 25⁰C, selama lima puluh menit pada suhu 42⁰C, dan selama lima

menit pada suhu 85⁰C.

4.7.7 Pembacaan IL-15 dan IFN γ dengan *Real Time-Polymerase*

Chain Reaction (RT-PCR)

4.7.7.1 Ekspresi gen IL-15 dan IFN γ dianalisa dengan menerapkan *quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*.

4.7.7.2 Campurkan 1 μ L cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR no ROX Mix sebanyak 10 μ L, forward primer 0,8 μ L, reverse primer 0,8 μ L dan NFW 7,4 μ L. Primer IL-15 yang dipergunakan ialah F: 5'-CCATCTCGTGCTACTTGTG-3' dan R: 5'-CTGTTTGCAAGGTAGAGCACG-3'. Primer IFN- γ yang dipergunakan ialah F: 5'-GATCCA-GCACAAAGCTGTCA-3' dan R: 5'-GACTCCTTT-TCCGCTTCCTT-3'

4.7.7.3 Proses qPCR dilakukan menggunakan suhu 95 ⁰C selama 2 menit, 95 ⁰C selama 5 detik dan 56 ⁰C selama 20 detik selama 40 siklus. Proses qPCR dilakukan dengan menganalisis probe terhidrolisis pada panjang gelombang 520 nm.

Dengan memakai perangkat lunak *EcoStudy*, peningkatan ekspresi gen dianalisis sehubungan dengan housekeeping gen.

4.8 Tempat dan Waktu Penelitian

4.8.1 Tempat Penelitian

Riset dijalankan di Integrated Laboratory of *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* dan FK Unissula Semarang.

4.8.2 Waktu Penelitian

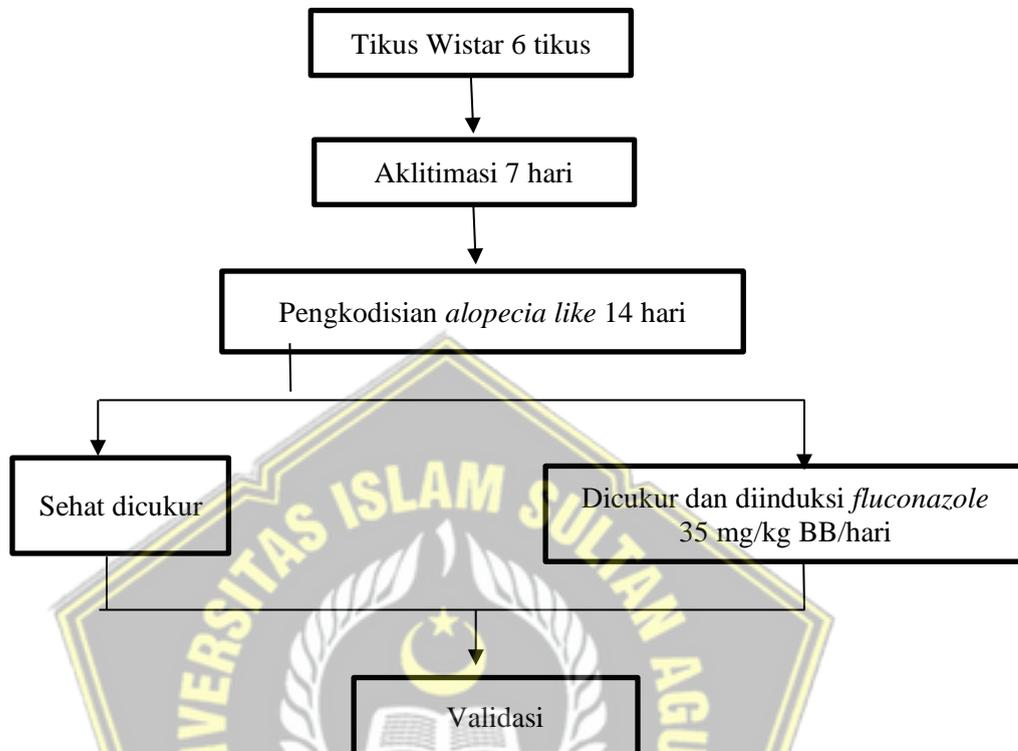
Riset dijalankan selama bulan September -Oktober 2023.

4.9 Analisa Data

Selanjutnya akan dijalankan uji deskriptif dengan memakai skala data rasio atas data yang dikumpulkan dari riset ini. Uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene* dipergunakan dalam menganalisa normalitas dan variasi data. Uji beda *One Way Anova* dijalankan terhadap distribusi data yang homogen ($p > 0,05$) dan normal ($p > 0,05$). Guna memastikan signifikansi gap antar kelompok riset, maka dijalankan uji *Post Hoc LSD* jika uji *One Way Anova* menghasilkan gap yang signifikan ($p < 0,05$) pada salah satu kelompok. Gap yang signifikan antar kelompok riset ditandai nilai signifikansi $p < 0,05$.

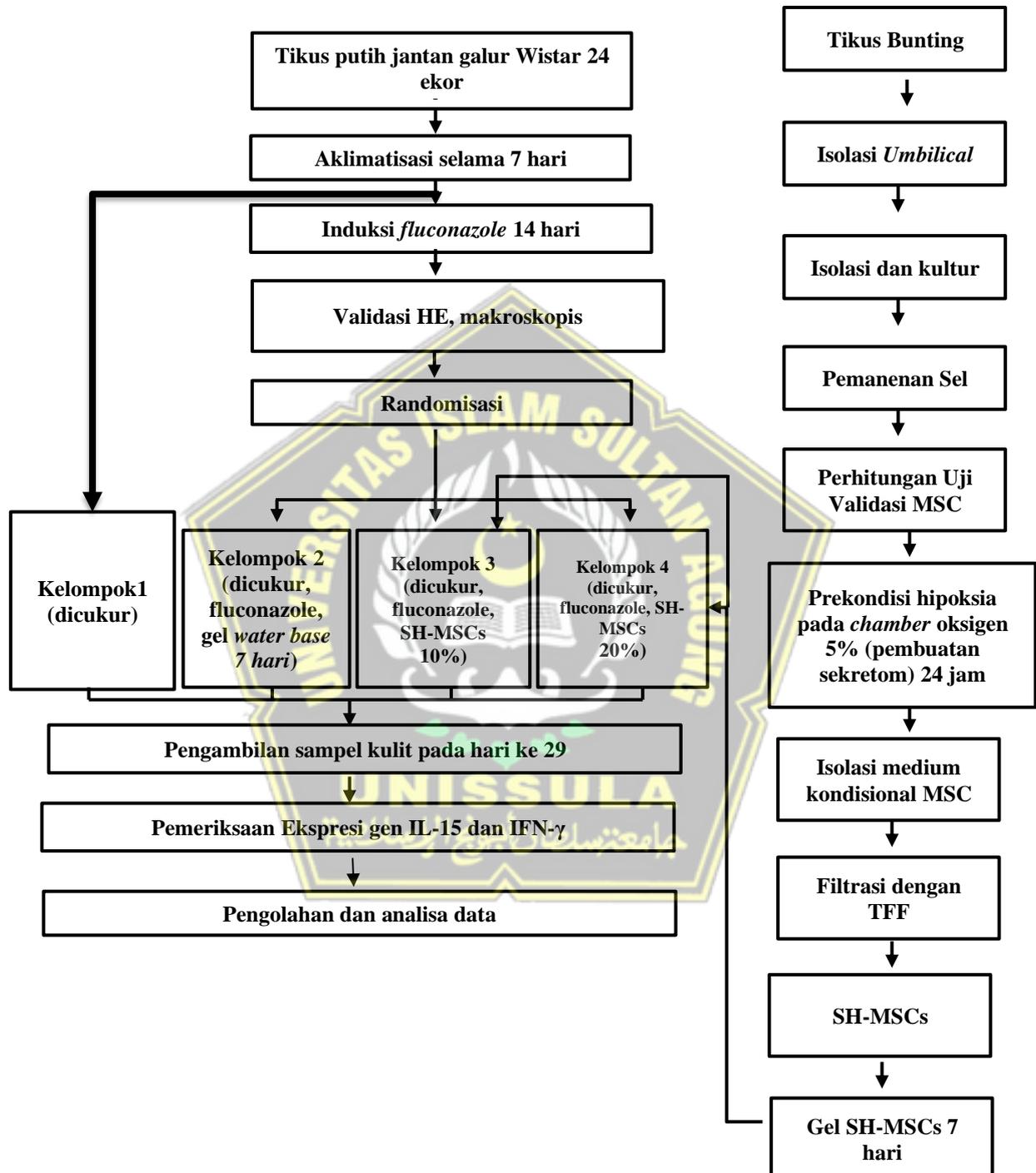
Uji *Kruskal Wallis* dipergunakan jika distribusi data tidak normal ($p < 0,05$). Uji *Mann Whitney* dipergunakan dalam memastikan signifikansi gap antar kelompok riset jika uji *Kruskal Wallis* menghasilkan gap yang signifikan ($p < 0,05$) pada salah satu kelompok. Gap yang signifikan antar kelompok riset ditandai dengan nilai signifikansi $p < 0,05$. Guna pengolahan analisis data pada riset ini dipergunakan aplikasi desktop SPSS 26.0 for *Windows*.

4.10 Preliminary Study



Validasi dilakukan dengan modifikasi penelitian terdahulu untuk menciptakan kondisi *alopecia like* yang diinduksi fluconazole.⁴¹ Maksud dicukur terlebih dahulu untuk menciptakan kondisi baseline kulit yang sama-sama botak di awal dan melihat proses pertumbuhan rambut antara tikus sehat dan tikus diinduksi flukonazole.

4.10 Alur Penelitian



Bagan 4.2 Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Riset ini tujuannya guna memastikan bagaimana pemberian SH-MSCs mempengaruhi ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada tikus *Wistar* jantan, yang dipergunakan sebagai model yakni *alopecia like* yang diinduksi flukonazol. Riset ini ialah proyek eksperimental yang dijalankan di bulan September-Oktober 2023 di laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Semarang.

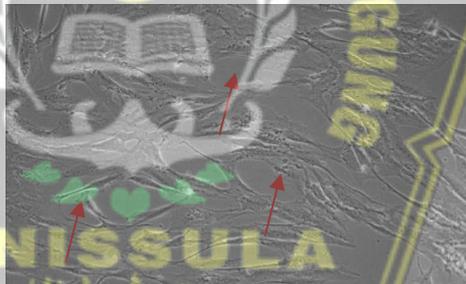
Rumus Federer menghasilkan total 24 ekor tikus *Wistar* jantan sebagai subjek riset ini. Perlakuan yang diberikan pada tikus tersebut menghasilkan pembagian menjadi empat kelompok: Tikus jantan galur *Wistar* pada Grup 1 (K1) dalam keadaan sehat dan bercukur; tikus jantan strain *Wistar* pada Grup 2 (K2) mempunyai model *alopecia like* yang diinduksi flukonazol yang diberi NaCl; tikus *Wistar* jantan di Grup 3 (K3) memiliki model *alopecia like* yang diinduksi flukonazol dan menerima 10% SH-MSC topikal; dan tikus *Wistar* jantan di Grup 4 (K4) memiliki model *alopecia like* yang diinduksi flukonazol dan menerima 20% SH-MSC topikal.

Sh-MSCs yang dipergunakan pada riset ini berasal dari tali pusar tikus yang berusia 21 hari pada masa kehamilan. Validasi MSCs melibatkan penilaian kemampuan diferensiasi menjadi sel-sel tulang (osteogenik) dan sel-sel tulang (adipogenik) analisis karakteristik fenotif sel dengan menggunakan metode flowcytometry. Setelah sel-sel ini lulus uji validasi, selanjutnya diinkubasi dalam kondisi hipoksia.

5.1 HASIL PENELITIAN

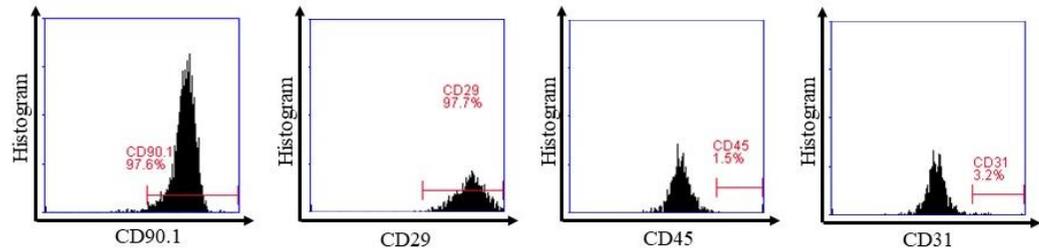
5.1.1 Isolasi dan diferensiasi MSCs menjadi osteosit dan berdiferensiasi menjadi Adiposit

MSC yang dipergunakan pada riset ini diisolasi di Laboratorium SCCR dari tali pusat tikus hamil yang berumur 21 hari. Selanjutnya hasil isolasi ditumbuhkan dalam labu plastik yang dilengkapi dengan media tertentu. Setelah tahap kelima, hasil kultur MSC ditampilkan, seperti terlihat pada Gambar 5.1, berupa gambar sel yang menempel pada dasar labu yang memiliki morfologi yang jika dilihat di bawah mikroskop menyerupai sel mirip gelendong.



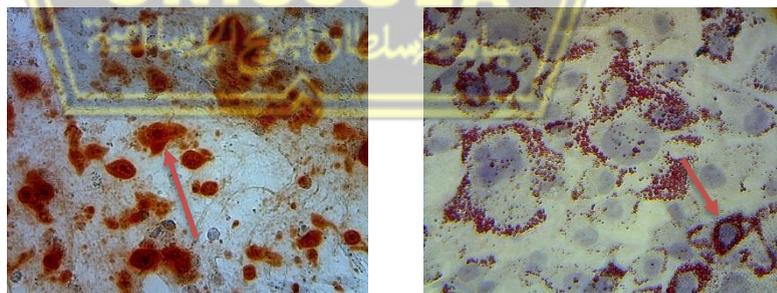
Gambar 5.1 hasil kultur MSCs sel berbentuk *spindle-like* dengan pembesaran 100x.

Flow cytometry dipergunakan memverifikasi validitas isolasi MSC dengan menilai kapasitas sel guna mengekspresikan penanda permukaan target yang berbeda. Didasarkan atas temuan riset, MSC mengekspresikan CD90.1 hingga 97,6%, CD29 hingga 97,7%, dan CD45 masing-masing hanya sekitar 1,5% dan 3,2%, seperti terlihat pada Gambar 5.2..



Gambar 5.2 Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90.1 , CD29, CD45 dan CD31

Kapasitas MSC guna berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel dewasa juga diperiksa dalam riset ini. Sebuah media yang diciptakan khusus guna mendorong diferensiasi MSC menjadi osteosit dan adiposit diberikan kepada mereka. Temuan riset memperlihatkan bahwasanya MSC berdiferensiasi menjadi osteosit dan adiposit, yang dibedakan dari endapan kalsium juga adanya lemak merah pada tiap kultur osteogenik dan adipogenik yang dideteksi dengan pewarnaan Alizarin Merah dan pewarnaan minyak Merah.



Gambar 5. 3 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit (kiri) dan (kanan) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red* pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam)

5.1.2 Profiling kandungan biomolekul SH-MSCs

Medium Bersyarat, atau media pertumbuhan yang berasal dari SH-MSC, diperoleh setelah masa inkubasi 24 jam MSC yang diperoleh dari tali pusat dalam kondisi hipoksia. Guna membuat SH-MSC murni untuk penyelidikan ini, para peneliti memisahkan faktor pertumbuhan dan sitokin yang ada dalam media SH-MSC. Didasarkan kombinasi berat molekul dan batasan yang ditetapkan oleh riset sebelumnya, para peneliti memakai strategi TFF. Kaset filter dengan tiga kategori berat molekul—10–50 kDa sebanyak 50%, 50–100 kDa sebanyak 25%, dan 100–300 kDa sebanyak 25%—dipergunakan para peneliti guna mengisolasi molekul-molekul tersebut. Setelah prosedur penyaringan, para ilmuwan menerapkan tes ELISA guna menentukan jumlah faktor pertumbuhan dan sitokin yang ada di SH-MSC. SH-MSC mengandung VEGF 1015,43 pg/mL \pm 56,95, PDGF 1093,51 pg/mL \pm 53,85, bFGF 1167,31 pg/mL \pm 68,53, IL-10 675,31 pg/mL \pm 41,35, TGF- β 459,71 pg/mL \pm 20,03 (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Analisis kandungan molekul SH-MSCs

<i>Molecules</i>	<i>SH-MSCs Value \pm SE (pg/mL)</i>
VEGF	1015.43 \pm 56.95
PDGF	1093.51 \pm 53.85
bFGF	1167.31 \pm 68.53
IL-10	675.31 \pm 41.35
TGF-β	459.71 \pm 20.03

5.1.3 Validasi pembuatan animal model *Alopecia Like*

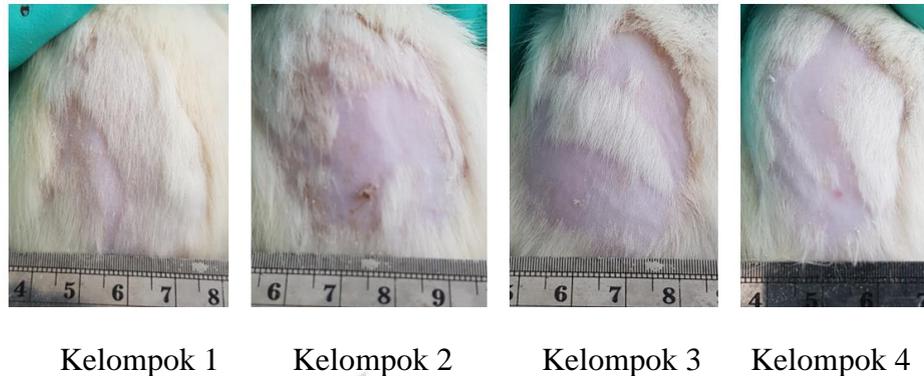
Didasarkan pada temuan validasi tikus model *Alopecia Like* (Gambar 5.4) terbukti bahwasanya *fluconazole* menghambat pertumbuhan rambut yang dibandingkan dengan kelompok sehat pada hari ke 14 sudah mengalami pertumbuhan rambut. Persentasi rerata kebotakan pada kelompok *fluconazole* mencapai 68.26% dengan standar deviasi 7.96% sedangkan pada kelompok sehat hanya 51,11% dengan standar deviasi 10,27%. Gambaran makroskopis seperti pada gambar 5.4 berikut:



Gambar 5.4 Komparasi hasil makroskopis tikus sehat dicukur hari 0 (A), tikus sehat dicukur hari 14 (B), tikus *alopecia like* diinduksi *fluconazole* hari ke 14 (C)

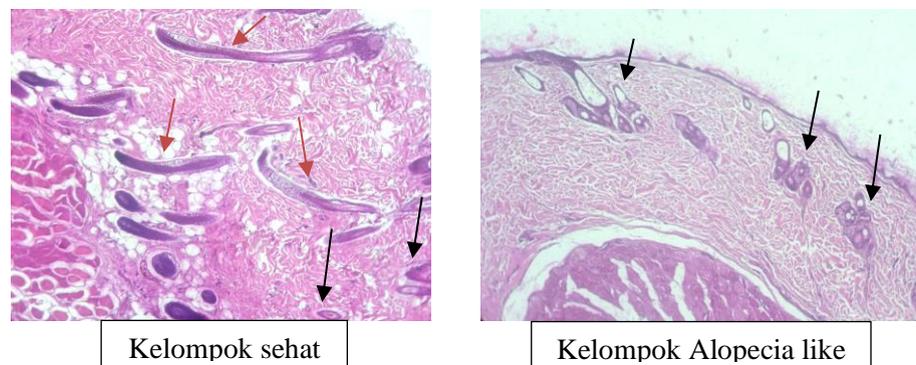


Gambar 5.5 Penghitungan luas area yang mengalami Alopecia, menggunakan Image J pada kamera pixel



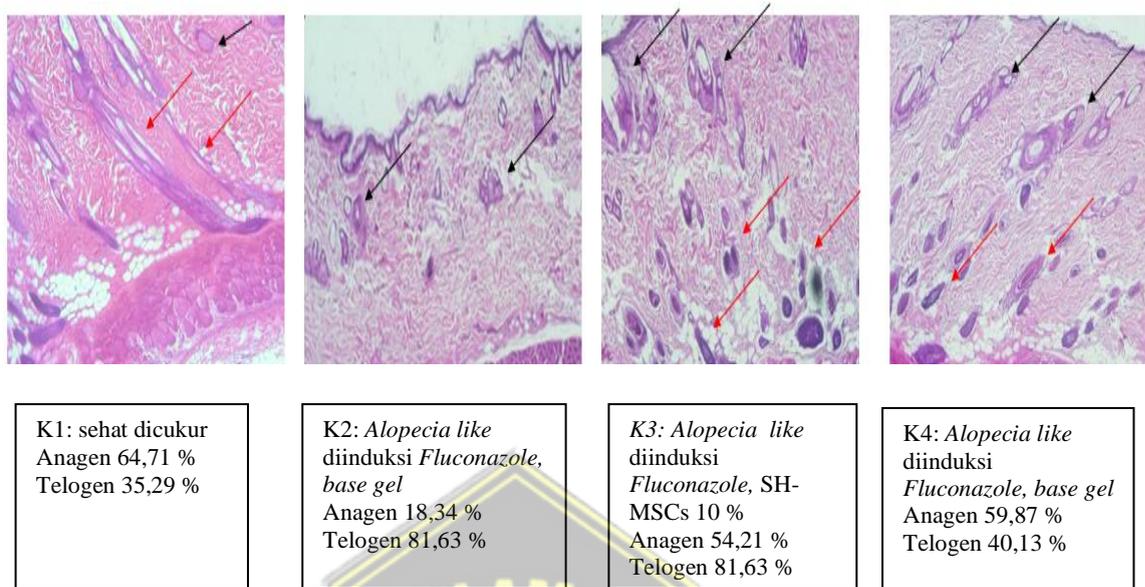
Gambar 5.6 Komparasi hasil makroskopis tikus sehat dengan tikus *alopecia like* pada hari ke 7 pemberian SH-MSCs

Kondisi perlakuan hewan coba yang mengalami gangguan pertumbuhan rambut, dilakukan analisa histopatologi pewarnaan HE. Hasil analisa pewarnaan HE kelompok tikus yang diinduksi dengan *Flukonazole* 35 mg/kg BB selama 14 hari mengalami kerontokan rambut dan hasil pengamatan preparat *alopecia like* tidak terdapat fase folikel anagen sehingga menyebabkan kerontokan pada subjek, sedangkan pada kelompok sehat terdapat fase folikel anagen rambut menggambarkan pertumbuhan rambut normal, hal ini menunjukkan bahwa tikus model *alopecia like* tervalidasi, seperti yang terlampir pada gambar 5.7 berikut:



Gambar 5.7 Komparasi hasil pengecatan HE hari ke 14 antara tikus sehat dicukur dan tikus *Alopecia Like* diinduksi fluconazole.

Panah hitam merupakan folikel telogen dan panah merah merupakan folikel anagen



Gambar 5.8 Komparasi hasil pengecatan HE setelah hari ke 7 pemberian SH-MSCs antara tikus sehat dan tikus *alopecia like*.

Panah hitam merupakan folikel telogen dan panah merah merupakan folikel anagen

5.1.5 Efek pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% pada ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ

Para peneliti menemukan bahwasanya pada model tikus *alopecia like* yang diinduksi flukonazol, SH-MSC bisa menurunkan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ . Sesuai dengan temuan riset yang ditampilkan pada tabel 5.2. Rata rata kadar IL-15 dan IFN- γ terendah terdapat pada kelompok K4 dengan nilai IL-15 $1,26 \pm 0,16$ dan kadar IFN- γ $0,61 \pm 0,95$.

Tabel 5. 2 Data hasil analisis statistik ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ

Variabel	Kelompok			p
	K2 Rata-rata \pm SD	K3 Rata-rata \pm SD	K4 Rata-rata \pm SD	
Ekspresi gen IL-15	3,19 \pm 0,25	2,18 \pm 0,14	1,26 \pm 0,16	
<i>Saphiro wilk</i>	0,63	0,37	0,17	
<i>Levene's Test</i>				0,69
<i>Oneway Anova</i>				0,00
Ekspresi gen IFN- γ	2,11 \pm 0,15	1,28 \pm 0,11	0,61 \pm 0,95	
<i>Saphiro wilk</i>	0,03	0,89	0,29	
<i>Levene's Test</i>				0,77
<i>Kruskal Wallis</i>				0,00

Keterangan :

- *Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)
- *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)
- *Oneway Anova* ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)
- *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

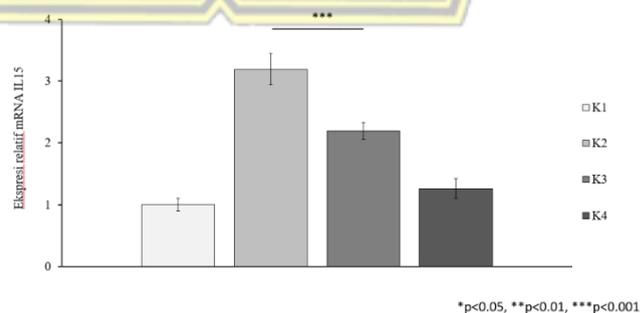
Seluruh hasil kadar IL-15 berdistribusi normal yang diperlihatkan dengan nilai p value uji *Shapiro-Wilk* $> 0,05$. Selain itu, ditunjukkan dengan nilai $p=0,69$ ($p > 0,05$) pada hasil *Levene's Test*, varians datanya juga homogen. Setelah dipastikan data kadar IL-15 mempunyai sebaran dan varian normal dan homogen, dijalankan analisa statistik parametrik uji *One Way Anova*. Kemudian didapat nilai $p=0,00$ ($p < 0,05$) yang memperlihatkan bahwasanya ada gap secara simultan antar kelompok riset. Uji *One Way Anova* menghasilkan hasil yang signifikan secara statistik. Tes *Post Hoc* kemudian dipergunakan menentukan kelompok dosis mana yang memiliki dampak terbesar pada tikus model *alopecia like*.

Varians datanya homogen dengan hasil *Levene's Test* yang ditunjukkan dengan nilai $p=0,77$ ($p > 0,05$). Namun hasil kadar IFN- γ

tidak berdistribusi normal seperti yang diperlihatkan pada kelompok K2 dengan uji *Shapiro Wilk* ($p > 0,05$) nilainya 0,03. Karena distribusi dan varians data tingkat IFN- γ ditemukan abnormal dan homogen, maka analisis statistik non-parametrik dijalankan dengan menerapkan uji *Kruskal Wallis*. Temuannya memperlihatkan ada gap rerata kadar IFN- γ yang signifikan antar kelompok, dengan nilai $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Tes *Kruskal Wallis* hasilnya signifikan secara statistik, kemudian diperiksa lebih lanjut dengan *Mann-Whitney* guna menentukan kelompok dosis mana yang memiliki dampak terbesar pada model tikus *alopecia like*.

5.1.5 Efek Pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% pada ekspresi gen IL-15

Pada penelitian ini di dapatkan rata rata ekspresi gen IL-15 tertinggi pada kelompok K2 $3,19 \pm 0,25$, pada kelompok K3 mengalami penurunan $2,18 \pm 0,14$ dan kelompok K4 kadar IL-15 dengan nilai terendah $1,26 \pm 0,16$ (gambar 5.6)



Gambar 5.4 Grafik Ekspresi gen IL-15 pada tiap kelompok penelitian Uji *One Way Anova* menghasilkan temuan statistik parametrik simultan. Tes *Post Hoc LSD* kemudian dipergunakan menentukan

kelompok dosis mana yang memiliki dampak terbesar pada tikus model *alopecia like*. Analisis Tabel 5.3 menggambarkan kelompok K2, K3, juga K4 berbeda nyata satu sama lain.

Tabel 5.3 Uji *Post Hoc* LSD kadar IL-15 pada masing-masing kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K2	K3	*0.000	0,7706	1,2359
	K4	*0.000	1,6951	2,1604
K3	K2	*0.000	-1,2359	-0,7706
	K4	*0.000	0,6918	1,1571
K4	K2	*0.000	-2,1604	-1,6951
	K3	*0.000	-1,1571	-0,6918

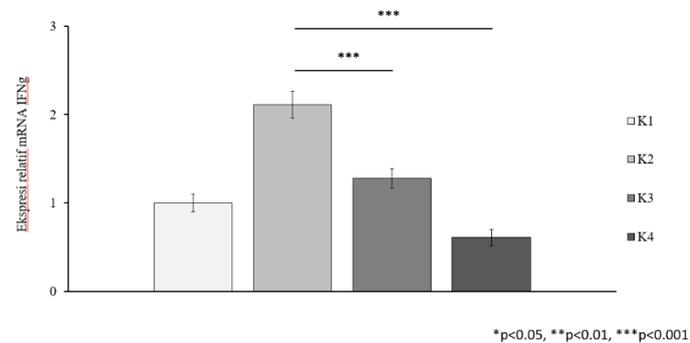
Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Didasarkan temuan riset, SH-MSCs bisa secara dramatis menurunkan kadar IL-15 pada tikus model *alopecia like*, tergantung pada konsentrasinya. Kelompok K4 memperlihatkan penurunan kadar IL-15 terendah, dengan konsentrasi 20% pada tikus model *alopecia like*.

5.1.6 Efek Pemberian gel topikal SH-MSCs 10 % dan 20 % pada ekspresi gen IFN- γ

Pada penelitian ini di dapatkan rata rata ekspresi gen IFN- γ tertinggi pada kelompok K2 $2,11 \pm 0,15$, pada kelompok K3 mengalami penurunan $1,28 \pm 0,11$ dan kelompok K4 kadar IFN- γ dengan nilai terendah $0,61 \pm 0,95$ (gambar 5.6)

Uji *Mann-Whitney* kemudian dipergunakan dalam menentukan



Gambar 5.5 Grafik Ekspresi gen IFN- γ pada tiap kelompok penelitian

kelompok perlakuan mana yang memberi dampak pada subjek tikus model *alopecia-like* sesudah temuan statistik non-parametrik uji *Kruskal Wallis* terbukti signifikan. Didasarkan analisis uji *Mann-Whitney* ditemukan gap secara simultan yakni 0,004 ($p<0,05$) antara kelompok K2 dan K3, dan gap yang serupa yakni 0,004 ($p<0,05$) antara K2 dan K4.

Pada K4 terdapat penurunan ekspresi gen IFN- γ dibanding K1, hasil analisis *Mann-Whitney* menunjukkan hasil antara K1 dan K4 berbeda bermakna 0,002 ($p<0,05$). Tentunya hal ini membutuhkan perhatian lebih lanjut karena IFN- γ sendiri adalah faktor pro-inflamasi, dimana penurunan lebih bermakna dibanding baseline kelompok sehat mungkin menyebabkan efek buruk terhadap pertahanan sistem imun lokal bila dilakukan jangka panjang,

Temuan riset ini memperlihatkan bahwasanya, tergantung pada konsentrasinya, SH-MSCs bisa menurunkan kadar IFN- γ secara simultan pada tikus model *alopecia like*. Kelompok K4 menurun di

kadar IFN- γ paling rendah pada konsentrasi kelompok 20%.

5.2 PEMBAHASAN

Pada Alopecia gangguan sistem imun menjadi sorotan utama, namun pada Alopecia secara keseluruhan dapat disebabkan berbagai faktor, terutama peradangan dan gangguan imun. Faktor risiko *alopecia* meliputi genetika, pola makan, toksisitas lingkungan, penyakit, dan berbagai produk serta obat yang secara langsung ataupun tidak berkontribusi atas patofisiologi kondisi tersebut.¹⁻

3

Pada penelitian kali ini yang menggunakan *fluconazole* untuk menginduksi *alopecia like* terdapat peningkatan ROS yang menjadikan kaskade *alopecia*. Terdapat perlambatan dari pertumbuhan rambut pada model histopatologi. Ditemukan pula peningkatan faktor-faktor inflamasi termasuk sitokin yang khas pada *alopecia areata* yaitu ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ .^{20,21,24}

Berdasarkan penelitian sebelumnya ditemukan didapatkan bukti bahwa faktor peradangan dan sistem imun berkontribusi terhadap etiopatogenesis *alopecia*. Faktor transkripsi NF- κ B memiliki peran dalam mengatur berbagai fungsi dalam sistem kekebalan alamiah dan adaptif, serta berperan sebagai mediator penting dalam merespons kondisi peradangan. Selain berperan dalam mengatur proses inflamasi, NF- κ B juga memicu ekspresi beberapa gen yang bersifat proinflamasi, seperti gen yang mengkode sitokin dan kemokin. Oleh karena itu, aktivasi yang tidak terkontrol dari NF- κ B dapat berkontribusi pada perkembangan berbagai penyakit yang berkaitan dengan peradangan.^{39,44}

Faktor stimulasi dapat mengaktifkan sel T CD8⁺ NKG2D⁺ dan menghasilkan IFN- γ melalui jalur JAK 1 dan JAK 3, IFN- γ dapat meningkatkan produksi IL-15 pada sel epitel folikuler melalui JAK1 dan JAK 2. IL-15 kemudian berikatan dengan sel CD8⁺ NKG2D⁺ T untuk menghasilkan lebih banyak IFN- γ yang memperkuat loop umpan balik positif. IFN- γ mendorong kerapuhan dari folikel rambut yang mengarah pada pemaparan auto-antigen CD8⁺ NKG2D⁺ dan memfasilitasi serangan autoimun pada folikel rambut. Sementara itu, sel inflamasi lainnya seperti sel CD 4⁺, sel NK T, sel mast, dan eosinofil terakumulasi di sekitar umbi rambut.⁴²

Temuan riset ini memperlihatkan bahwasanya kelompok K4 (SH-MSCs 20%) berkadar IL-15 dan IFN- γ yang jauh lebih rendah dibanding kelompok lainnya. Uji *One way Anova* ($p < 0,05$) hasilnya $p = 0,000$ untuk kadar IL-15, dan uji *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) hasilnya $p = 0,000$ untuk kadar IFN- γ . Temuan ini memperlihatkan bahwasanya pemberian SH-MSc 20% bisa memodulasi imunitas dan mengurangi respons inflamasi. Hal ini bisa saja disebabkan oleh efek IL-10, yang ada di SH-MSCs dan berfungsi sebagai agen antiinflamasi dengan memblokir jalur NF- κ B melalui jalur IL-10 STAT3.^{39, 44} Riset ini konsisten dengan riset milik Kuntardjo dkk. (2019), yang menggunakan SH-MSc 200 μ L/kgBB pada luka dan mengamati penurunan peradangan dan penyembuhan luka yang lebih cepat. Riset tambahan memperlihatkan bahwasanya jalur IL-10 STAT3 diaktifkan, menyebabkan penurunan peradangan. Ketika IL-10 berikatan dengan reseptor IL-10 (IL-10R), JAK1 diaktifkan, yang memulai fosforilasi STAT3. Setelah memasuki inti sel,

protein STAT3 menyebabkan ekspresi urutan mRNA SOSC3. Urutan mRNA ini kemudian diekspresikan secara intraseluler juga memiliki kemampuan guna memblokir jalur sinyal inflamasi seperti NF- κ B. IL-6 dan sitokin inflamasi lainnya akan disekresikan lebih sedikit ketika jalur NF- κ B dihambat.¹⁹

Pada penelitian ini sulit untuk membuat tikus model autoimun *alopecia areata*, sehingga dibuat model tikus *alopecia like* dengan media *fluconazole* untuk mencetuskan peradangan, sebagai bahan pembelajaran untuk alopecia pada umumnya. Dalam patofisiologi *alopecia areata*, terjadi penghambatan pertumbuhan pada folikel rambut sebagai akibat peradangan yang bersumber dari proses autoimun, yang kemudian mengakibatkan peningkatan fase teolgen dan penghambatan fase anagen, terdapat juga peradangan folikel peribulbar.⁴³ Dalam penelitian ini, hasilnya menunjukkan ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ pada kelompok K4 (SH-MSCs 20%) dan kelompok K3 (SH-MSCs 10%) mengalami penurunan bila dibandingkan pada kelompok tikus kontrol.

Perbedaan signifikan pada kelompok K4 dengan penurunan paling signifikan dibandingkan dengan kelompok lainnya. Oleh karena itu, pemberian SH-MSCs 20% dapat mengurangi ekspresi gen IL-15 dan IFN- γ tikus model *alopecia like*. Hal ini diduga karena terjadi regulasi sistem imun dan penurunan peradangan folikel rambut yang dipengaruhi oleh kandungan IL-10 dan TGF- β pada SH-MSCs.

Riset ini konsisten dengan riset menurut Deng et al, (2021) menggunakan *Hair follicle* HF-MSCs tikus, di mana dilaporkan gejala mirip AA berkurang

ketika model AA in vitro yang diinduksi IFN- γ dikultur bersama dengan HF- MSC selama 2 hari. Selain itu, ketika model mencit C3H/HeJ AA yang dicangkokkan kulit diinjeksi dengan 106 HF MSCs seminggu sekali selama 3 minggu, transkripsi profiling dan analisis imunofluoresensi menggambarkan bahwa pengobatan HF-MSCs secara signifikan menurunkan kerontokan rambut tikus dan mengurangi peradangan di sekitar HF baik secara in vitro dan in vivo.⁴⁴

Secretome adalah ekstrak yang terdiri dari protein larut, lipid, asam nukleat, dan vesikel ekstraseluler berasal dari media tempat sel induk dikultur.^{37,44} Penelitian terbaru menunjukkan bahwa efek pengobatan MSCs berhubungan dengan secretomanya, yang mendukung pemulihan folikel rambut karena terdapat *insulin growth factor* (IGF), VEGF dan *growth factor* lain yang menginduksi regenerasi, pertumbuhan sel, diferensiasi dan imunoregulasi. *Secretome* juga mampu meregulasi protein, lipid, dan miRNA ke sel penerima dan mengatur peradangan pada jaringan yang terluka. Eksosom dapat memediasi aktivitas anti-inflamasi dan memiliki peran komunikasi antara MSCs dan microenvironment folikel rambut.

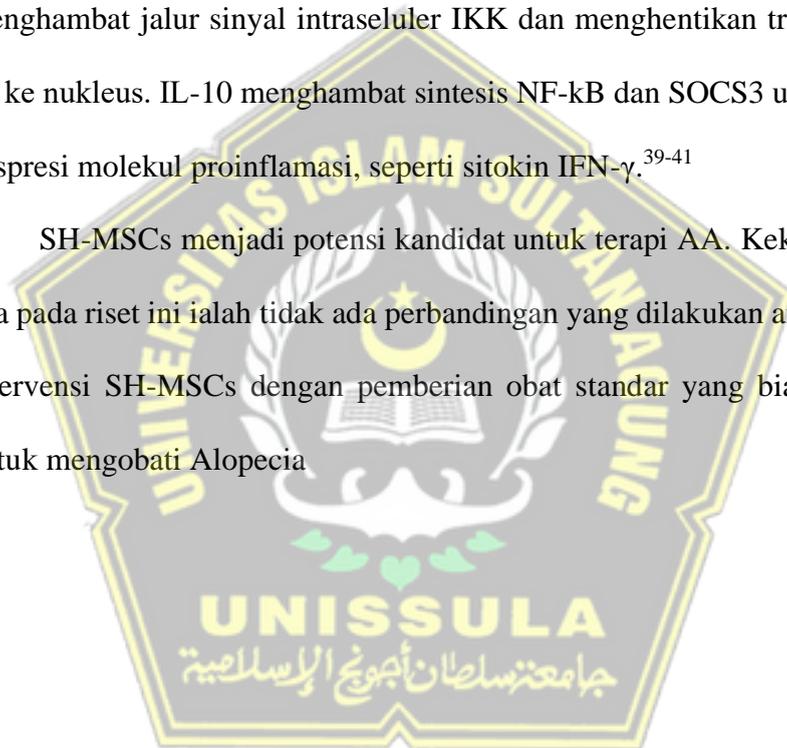
Faktor transkripsi NF- κ B diaktifkan ketika kondisi proinflamasi menyebabkan NF- κ B dilepaskan dari kompleks IKK dan bermigrasi menuju nukleus. Hasilnya, ekspresi gen yang mengkode molekul pro-inflamasi yang berbeda meningkat. NF- κ B terlibat dalam regulasi peradangan dan berperan dalam menginduksi ekspresi beberapa gen proinflamasi, seperti gen yang menghasilkan sitokin dan kemokin. Terdapat banyak penelitian ilmiah yang

telah mengkonfirmasi berbagai mekanisme patogenesis penyakit yang terkait dengan peradangan. Gen target yakni IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dipicu secara transkripsi ketika jalur NF- κ B diaktifkan.⁴⁰



JAK-1 mentranslokasi dari membran intraseluler ke sitoplasma ketika IL-10 yang diproduksi dari SH-MSC mengaktifkan jalur STAT3. Hal ini mempengaruhi translokasi STAT3 ke nukleus dan fosforilasinya. Gen SOCS3 dapat diaktifkan melalui translokasi STAT3 ke nukleus, memungkinkan terjadinya sintesis protein yang kemudian dilepaskan ke sitoplasma. Ekspresi gen pro-inflamasi dicegah dengan ekspresi SOCS3 di sitoplasma, yang menghambat jalur sinyal intraseluler IKK dan menghentikan translokasi NF- κ B ke nukleus. IL-10 menghambat sintesis NF- κ B dan SOCS3 untuk menekan ekspresi molekul proinflamasi, seperti sitokin IFN- γ .³⁹⁻⁴¹

SH-MSCs menjadi potensi kandidat untuk terapi AA. Kekurangan yang ada pada riset ini ialah tidak ada perbandingan yang dilakukan antara efek dari intervensi SH-MSCs dengan pemberian obat standar yang biasa digunakan untuk mengobati Alopecia



BAB VI

KESIMPULAN

6.1 Kesimpulan

Didasarkan atas temuan riset, maka simpulan yang dapat diambil ialah:

6.1.1 Pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% berpengaruh terhadap penurunan ekspresi gen IL-15 pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole* dengan dosis optimal di 20%.

6.1.2 Pemberian gel topikal SH-MSCs dosis 10% dan 20 % berpengaruh terhadap penurunan ekspresi gen IFN- γ pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole* dengan dosis optimal di 20%.

6.2 Saran

Rekomendasi bagi riset berikutnya antara lain:

6.2.1 Penelitian selanjutnya melihat pengaruh dosis lebih besar dengan perbandingan obat standar yang biasa digunakan untuk mengobati *alopecia* terhadap tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *fluconazole*.

6.2.2 Penelitian selanjutnya perlu dilakukan penelitian menggunakan sekretom yang di isolasi dari *Hair follicle* untuk membandingkan efektifitas sekretom dalam menurunkan kadar IL-15 dan IFN- γ .

DAFTAR PUSTAKA

1. Maloh J, Engel T, Natarelli N, Nong Y, Zufall A, Sivamani RK. Systematic Review of Psychological Interventions for Quality of Life, Mental Health, and Hair Growth in Alopecia Areata and Scarring Alopecia. *J Clin Med.* 2023;12(3). doi:10.3390/jcm12030964
2. Asghar F, Shamim N, Farooque U, Sheikh H, Aqeel R. Telogen Effluvium: A Review of the Literature. *Cureus.* Published online May 27, 2020. doi:10.7759/cureus.8320
3. Chien Yin GO, Siong-See JL, Wang ECE. Telogen Effluvium – a review of the science and current obstacles. *J Dermatol Sci.* 2021;101(3):156-163. doi:10.1016/j.jdermsci.2021.01.007
4. Agamia N, Apalla Z, El Achy S, Abdelmaksoud E, Kandil N, Abozeid S. Interferon-gamma serum level and immunohistochemical expression of CD8 cells in tissue biopsies in patients with alopecia areata in correlation with trichoscopic findings. *Dermatol Ther.* 2020;33(4). doi:10.1111/dth.13718
5. Xing L, Dai Z, Jabbari A, et al. Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat Med.* 2014;20(9):1043-1049. doi:10.1038/nm.3645
6. Madras DK, Rocka A, Piędel F, Psiuk D, Nowak E. Increase in IL-15 levels in patients with alopecia areata. *Journal of Education, Health and Sport.* 2020;10(9):76-83. doi:10.12775/jehs.2020.10.09.008
7. Lee YJ, Park SH, Park HR, Lee Y, Kang H, Kim JE. Mesenchymal stem cells antagonize ifn-induced proinflammatory changes and growth inhibition effects via wnt/ β -catenin and jak/stat pathway in human outer root sheath cells and hair follicles. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9). doi:10.3390/ijms22094581
8. Varman PM, Paul CMP, Rajan P, et al. Study on hair fall with hair related problems among males of age 18-50 years: Study on Chennai based population. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2018;12(10):LC09-LC12. doi:10.7860/JCDR/2018/36050.12175
9. Sani H, Ogunbiyi Oa, George A, Okoro O. Prevalence and pattern of alopecia in secondary and tertiary institutions in Ibadan. *Sub-Saharan African Journal*

- of Medicine*. 2016;3(3):148. doi:10.4103/2384-5147.190856
10. Reborá A, Guarrera M, Baldari M, Vecchio F. Distinguishing Androgenetic Alopecia From Chronic Telogen Effluvium When Associated in the Same Patient: A Simple Noninvasive Method. *Arch dermatol*. 2005;141:1243-1245. <http://archderm.jamanetwork.com/>
 11. Abdel-Hafez K, Abdel-Aty MA, Hofny ERM. Prevalence of skin diseases in rural areas of Assiut Governorate, Upper Egypt. *Int J Dermatol*. 2003;42:887-892.
 12. Nalluri R, Harries M. *CMJv16n1-Harries.Indd*. Vol 16.; 2016.
 13. Kim KS, Choi YK, Kim MJ, et al. Umbilical cord-mesenchymal stem cell-conditioned medium improves insulin resistance in c2c12 cell. *Diabetes Metab J*. 2020;44(44). doi:10.4093/dmj.2019.0191
 14. Nagamura-Inoue T. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells*. 2014;6(2):195. doi:10.4252/wjsc.v6.i2.195
 15. Gentile P, Garcovich S. Autologous activated platelet-rich plasma (AA-PRP) and non-activated (A-PRP) in hair growth: a retrospective, blinded, randomized evaluation in androgenetic alopecia. *Expert Opin Biol Ther*. 2020;20(3):327-337. doi:10.1080/14712598.2020.1724951
 16. Li Y, Wang G, Wang Q, Zhang Y, Cui L, Huang X. Exosomes Secreted from Adipose-Derived Stem Cells Are a Potential Treatment Agent for Immune-Mediated Alopecia. *J Immunol Res*. 2022;2022. doi:10.1155/2022/7471246
 17. Bak DH, Choi MJ, Kim SR, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells engineered to overexpress growth factors accelerate outcomes in hair growth. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2018;22(5):555-566. doi:10.4196/kjpp.2018.22.5.555
 18. Olayinka J (Jadé) T, Richmond JM. Immunopathogenesis of alopecia areata. *Current Research in Immunology*. 2021;2:7-11. doi:10.1016/j.crimmu.2021.02.001
 19. Kuntardjo N, Dharmana E, Chodidjah C, Nasihun TR, Putra A. TNF- α -Activated MSC-CM Topical Gel Effective in Increasing PDGF Level,

- Fibroblast Density, and Wound Healing Process Compared to Subcutaneous Injection Combination. *Majalah Kedokteran Bandung*. 2019;51(1):1-6. doi:10.15395/mkb.v51n1.1479
20. Kamil ZA, Abdullah GA, Zalzala HH. Interleukin-15 and Tumor Necrosis Factor- α in Iraqi Patients with Alopecia Areata. *Dermatol Res Pract*. 2023;2023. doi:10.1155/2023/5109772
 21. El Aziz Ragab MA, Hassan EM, EL Moaty El Niely DA, Mohamed MM. Serum level of interleukin-15 in active alopecia areata patients and its relation to age, sex, and disease severity. *Postepy Dermatol Alergol*. 2021;37(6):904-908. doi:10.5114/ada.2020.102103
 22. Howell MD, Kuo FI, Smith PA. Targeting the Janus Kinase Family in Autoimmune Skin Diseases. *Front Immunol*. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02342
 23. Atef R, Elshafy A, Khalifa NA, et al. *Alopecia Areata: An Overview of the Disease and Its Genetic Basis: Review Article*. Vol 88.; 2022. <https://ejhm.journals.ekb.eg/>
 24. Suchonwanit P, Kositkuljorn C, Pomsong C. Alopecia Areata: An Autoimmune Disease of Multiple Players. *Immunotargets Ther*. 2021;Volume 10:299-312. doi:10.2147/itt.s266409
 25. Pratt CH, King LE, Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. Alopecia areata. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3. doi:10.1038/nrdp.2017.11
 26. Du L, Lv R, Yang X, Cheng S, Ma T, Xu J. Hypoxic conditioned medium of placenta-derived mesenchymal stem cells protects against scar formation. *Life Sci*. 2016;149:51-57. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.050
 27. Kosaric N, Srifa W, Bonham CA, et al. Macrophage Subpopulation Dynamics Shift following Intravenous Infusion of Mesenchymal Stromal Cells. *Molecular Therapy*. 2020;28(9):2007-2022. doi:10.1016/j.ymthe.2020.05.022
 28. Matthay MA, Calfee CS, Zhuo H, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. *Lancet Respir*

- Med.* 2019;7(2):154-162. doi:10.1016/S2213-2600(18) 30418-1
29. Lee JH, Yoon YM, Lee SH. Hypoxic preconditioning promotes the bioactivities of mesenchymal stem cells via the HIF-1 α -GRP78-Akt axis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6). doi:10.3390/ijms18061320
 30. Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/AKT pathways. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):605-628. doi:10.3390/ijms 15010605
 31. Yu H, Xu Z, Qu G, et al. Hypoxic Preconditioning Enhances the Efficacy of Mesenchymal Stem Cells-Derived Conditioned Medium in Switching Microglia toward Anti-inflammatory Polarization in Ischemia/Reperfusion. *Cell Mol Neurobiol.* 2021;41(3):505-524. doi:10.1007/s10571-020-00868-5
 32. Isik B, Thaler R, Goksu BB, et al. Hypoxic preconditioning induces epigenetic changes and modifies swine mesenchymal stem cell angiogenesis and senescence in experimental atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-021-02310-z
 33. Nie Y, Han BM, Liu XB, et al. *Identification of MicroRNAs Involved in Hypoxia-and Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells.* Vol 7.; 2011. <http://www.biolsci.org>762
 34. Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, et al. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7). doi:10.3390/ijms20071656
 35. Li T, Ma H, Ma H, et al. Mussel-Inspired Nanostructures Potentiate the Immunomodulatory Properties and Angiogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(19):17134-17146. doi:10.1021/acsami.8b22017
 36. Montero-Vilchez T, Sierra-Sánchez Á, Sanchez-Diaz M, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Conditioned Medium for Skin Diseases: A Systematic Review. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9. doi:10.3389/fcell. 2021.654210
 37. Sun X, Hao H, Han Q, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance by suppressing NLRP3

- inflammasome-mediated inflammation in type 2 diabetes rats. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1). doi:10.1186/s13287-017-0668-1
38. Mysore V, Alexander S, Nepal S, Venkataram A. Regenerative Medicine Treatments for Androgenetic Alopecia. *Indian Journal of Plastic Surgery.* 2021;54(4):514-520. doi:10.1055/s-0041-1739257
39. Wu P, Zhang Y, Xing Y, et al. The balance of Bmp6 and Wnt10b regulates the telogen-anagen transition of hair follicles. *Cell Communication and Signaling.* 2019;17(1). doi:10.1186/s12964-019-0330-x
40. Choi BY. Targeting wnt/ β -catenin pathway for developing therapies for hair loss. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):1-16. doi:10.3390/ijms 21144915
41. Thompson III GR, Krois CR, Affolter VK, et al. Examination of Fluconazole-Induced Alopecia in an Animal Model and Human Cohort. Published online 2019. doi:10.1128/AAC
42. Byun JW, Kim HJ, Na K, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells prevent alopecia areata development through the inhibition of NKG2D expression: A pilot study. *Exp Dermatol.* 2017;26(6):532-535. doi:10.1111/exd.13255
43. Pratt CH, King LE, Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. Alopecia areata. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3. doi:10.1038/nrdp.2017.11
44. Deng W, Zhang Y, Wang W, et al. Hair follicle-derived mesenchymal stem cells decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce inflammation around the hair follicle. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-021-02614-0