

**PENGARUH PEMBERIAN GEL TOPIKAL  
*SECRETOME HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELL (SH -MSCs)*  
TERHADAP EKSPRESI GEN PDGF DAN IL-1 $\beta$   
(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Jantan Galur *Wistar*  
Model *Alopecia-Like* yang diinduksi *fluconazole*)**

**TESIS**

**untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2**



**Magister Ilmu Biomedik**

**Disusun Oleh:**

**Cleveria Jessika  
MBK. 22.19.010276**

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

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN GEL TOPIKAL *SECRETOME HYPOXIA*  
*MESENCHYMAL STEM CELLS* (SH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI  
GEN IL-1 $\beta$  DAN PDGF

(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Jantan Galur *Wistar* Model *Alopecia like* yang  
diinduksi *fluconazole*)

disusun oleh  
Cleveria Jessika

MBK.22.19.010276

yang dipertahankan di depan Tim Penguji

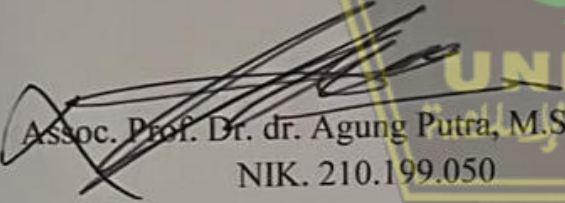
Oktober 2023

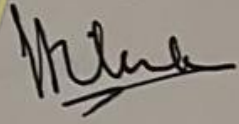
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui.

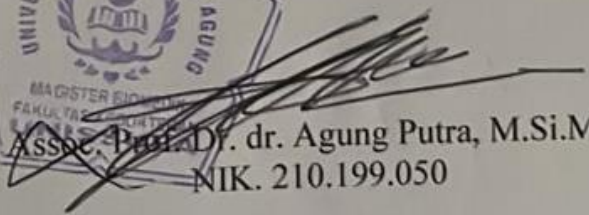
Pembimbing 1

Pembimbing 2

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

  
Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes  
NIK. 220.198.045

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

  
Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med  
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 magister di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan ataupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.



Semarang, November 2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cleveria Jessika', with a small 'v' and 'o' mark at the end of the signature.

(Cleveria Jessika)

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan proposal tesis dengan judul Pengaruh Pemberian Gel Topikal Secretome Hipoksia Mesenchymal Stem Cell (*SH -MSCs*) Terhadap Ekspresi Gen PDGF dan IL-1 $\beta$  (Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Jantan Galur *Wistar* Model *Alopecia-Like* yang diinduksi *fluconazole*).

Pada penyusunan proposal tesis ini penyusun mendapat bantuan pengarahan dan bimbingan, untuk itu pada penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya pada yang terhormat :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
3. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra., M.Si., Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan sekaligus sebagai pembimbing I dalam penelitian yang telah berkenan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan proposal tesis ini.
4. Prof . Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama

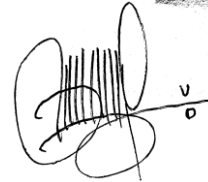
penyusunan tesis ini.

5. Dr. dr. Hadi Sarosa , M.Kes selaku penguji I yang telah memberikan dorongan , bimbingan dan kemudahan penyusun selama penyusunan tesis ini.
6. Dr. dr. Setyo Trisnodi , Sp KF, SH selaku penguji II yang telah memberikan dorongan , bimbingan masukan dan kemudahan penyusun selama penyusunan tesis ini .
7. Dr. dr. Danis Pertiwi , M.Si . Med , Sp PK selaku penguji III yang telah dengan sabar memberikan dorongan , bimbingan dan kemudahan penyusun selama penyusunan tesis ini .
8. Pada dosen pengajar dan rekan – rekan staf Magister Ilmu Biomedik yang tidak dapat disebutkan satu – satu yang telah memberikan doa dan dorongan kepada penyusun.
9. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga proposal tesis ini dapat terselesaikan.
10. Kepada suami dan anak – anak saya yang selalu memberi semangat dan support system terbaik dalam penyusunan tesis ini.
11. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan proposal tesis yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Manusia tidak luput dari kesalahan karena tidak ada manusia yang sempurna, untuk itu penyusun berharap dengan semua kekurangan dalam penulisan proposal tesis ini, tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Program Pendidikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik serta

bagi pihak – pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasanya melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua, amin

Semarang, November 2023



(Cleveria Jessika)



## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
PERNYATAAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis .....	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
1.5 Originalitas Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1 Cytokine pada Alopecia .....	8
2.1.1 <i>Interleukin-1<math>\beta</math></i> (IL-1 $\beta$ ).....	12
2.1.2 Platelet derivated Growth Factor (PDGF) .....	13

2.2 Mesenchymal Stem Cells (MSCs) .....	16
2.2.1. Definisi .....	16
2.2.2. Sumber MSCs .....	16
2.2.3. Karakteristik MSCs .....	17
2.2.4. Peran MSCs .....	18
2.3. Hipoksia .....	19
2.4. <i>Secretome</i> MSCs .....	19
2.5 Alopecia -like .....	8
2.5.1. Definisi .....	8
2.5.2. Proses <i>Alopecia</i> .....	9
2.6 Pengaruh MSC terhadap PDGF dan IL-1 $\beta$ .....	21
<b>BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS .....</b>	<b>22</b>
3.1. Kerangka Teori .....	22
3.2. Kerangka Konsep .....	24
3.3. Hipotesis .....	25
<b>BAB IV METODE PENELITIAN .....</b>	<b>26</b>
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian .....	26
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	27
4.2.1. Variabel Penelitian .....	27
4.2.2. Definisi Operasional .....	27
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian .....	29



4.3.1. Subyek Penelitian .....	29
4.3.2. Sampel Penelitian .....	29
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian .....	29
4.3.4. Besar Sampel .....	30
4.4. Alat dan Bahan .....	31
4.4.1. Alat .....	31
4.4.2. Bahan .....	31
4.5. Cara Penelitian .....	32
4.5.1. Perolehan Ethical Clearance .....	32
4.5.2. Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord .....	32
4.5.3. Proses Hipoksia .....	33
4.5.4. Pembuatan Sediaan Gel .....	34
4.5.5. Pembuatan Alopecia dan Pemberian Perlakuan .....	35
4.5.6. Terminasi dan pengambilan jaringan .....	36
4.5.9. Pembacaan IL1/PDGF dengan (RT-PCR) .....	40
4.6 Tempat dan Waktu Peneltian .....	41
4.6.1 Tempat Penelitian .....	41
4.6.2. Waktu Penelitian .....	41
4.7 Analisa Data .....	41
4.8 Preliminary Study .....	43
4.9 Alur Penelitian .....	44

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....	42
5.1. Hasil Penelitian .....	42
5.1.1. Isolasi Secretome <i>Mesenchymal Stem Cell</i> Hipoksia (S-MSCs).....	42
5.1.2. Efek pemberian gel S-MSCs terhadap ekspresi mRNA PDGF.....	47
5.1.3. Efek pemberian gel S-MSCs terhadap ekspresi mRNA IL-1 $\beta$ .....	49
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	52
5.3. Kelemahan Penelitian.....	54
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	56
6.1 Kesimpulan.....	56
6.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA .....	57

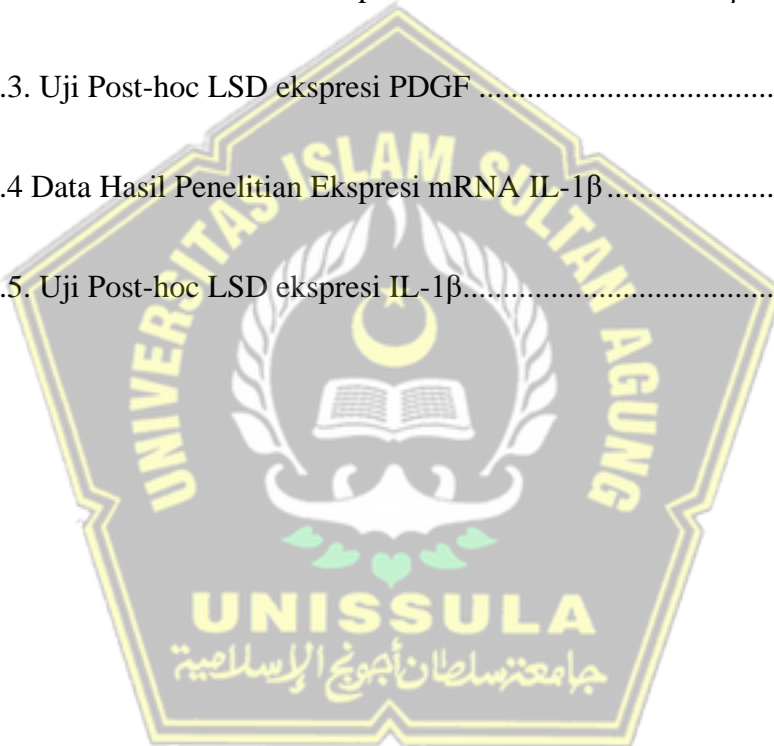


## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Sumber mesenchymal stem cell (MSCs) .....	14
Gambar 2.2 Kemampuan diferensiasi dari MSCs.....	15
Gambar 2.3 Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs.....	16
Gambar 3.1 Kerangka Teori.....	24
Gambar 3.3 Kerangka Konsep .....	24
Gambar 4.1 Gambar Rancangan Penelitian .....	27
Gambar 4.2 Bagan Alur Preliminary Study .....	42
Gambar 4.3 Bagan Alur Penelitian .....	43
Gambar 5.1. (A) Isolasi MSC dengan konfluen 80% .....	43
Gambar 5.2. (A) MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit dan Adiposit.....	44
Gambar 5.3 Validasi makroskopis .....	45
Gambar 5.4. Morfologi folikel kulit hewan model H-14.....	46
Gambar 5.5 Morfologi follicle kulit hewan model H-19.....	47
Gambar 5.6. Grafik ekspresi PDGF .....	49
Gambar 5.7. Grafik ekspresi IL-1 $\beta$ .....	51

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas penelitian.....	5
Tabel 5.1 Perbandingan Fase Anagen dan Telogen Pada Hari ke-19.....	47
Tabel 5.2 Data Hasil Penelitian Ekspresi mRNA PDGF dan IL-1 $\beta$ .....	48
Tabel 5.3. Uji Post-hoc LSD ekspresi PDGF .....	49
Tabel 5.4 Data Hasil Penelitian Ekspresi mRNA IL-1 $\beta$ .....	50
Tabel 5.5. Uji Post-hoc LSD ekspresi IL-1 $\beta$ .....	51



**ABSTRAK**  
**PENGARUH SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCs)**  
**HIPOKSIA TERHADAP EKSPRESI GEN PDGF DAN IL-1 $\beta$**

**Latar Belakang :** Salah satu agen penyebab *alopecia - like* adalah *fluconazole*. Obat *fluconazole* dan triazole menunjukkan interaksi dengan sistem P-450. *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) banyak digunakan dalam rekayasa jaringan dan kedokteran regenerative. *Terapi ini* secara khusus dapat menjadi agen alternatif untuk mencegah *Alopecia-like*.<sup>11</sup> Penelitian terdahulu melaporkan beberapa penelitian yang membuktikan manfaat *stem cell* terhadap *alopecia*. Mengungkap dampak SH-MSCs selama pembentukan gel pada ekspresi gen PDGF dan IL-1 $\beta$  pada kulit model *alopecia* yang diinduksi *fluconazole* secara *in vivo* ialah maksud studi ini.

**Metode:** Studi eksperimental menggunakan konfigurasi *post test control group*. *Fluconazole* diberikan secara topikal pada kelompok tikus dalam keadaan sehat, serta kelompok kontrol positif yang menerima pemberian topikal berbasis gel SH-MSCs. Sementara itu, *fluconazole* tidak diberikan pada tikus dalam keadaan sehat. Selama tujuh hari, kelompok diberikan gel SH-MSCs topikal 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari, sedangkan kelompok kontrol berbasis gel diberikan *base gel*. Pada hari ke 14, terminasi dilakukan, dan qRT-PCR dimanfaatkan guna menilai ekspresi PDGF dan IL-1 $\beta$ . ANOVA satu arah dengan pengujian perbedaan kelompok menggunakan LSD *post hoc* diterapkan dalam pemeriksaan statistik perbedaan antar kelompok perlakuan.

**Hasil:** Dibandingkan dengan kelompok kontrol, analisis ekspresi gen PDGF pada K3 ( $0,806 \pm 0,12$ ) dan K4 ( $1,71 \pm 0,31$ ) lebih tinggi. Disisi lain, K3 ( $2,71 \pm 0,23$ ) dan K4 ( $1,41 \pm 0,20$ ) dengan kelompok kontrol, IL-1 $\beta$  menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi SH-MSCs.

**Kesimpulan:** Pemberian gel SH-MSCs secara signifikan berdampak pada laju peningkatan ekspresi PDGF dan penurunan ekspresi IL-1 $\beta$ .

**Kata Kunci:** *alopecia-like, IL-1 $\beta$ , PDGF dan SH-MSCs,*

**ABSTRACT**  
**EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCS) HYPOXIA ON  
PDGF AND IL-1 $\beta$  GEN EXPRESSION**

**Background:** One of the causative agents of alopecia-like is fluconazole. Fluconazole and triazole drugs show interaction with the P-450 system. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) are extensively employed in the fields of regenerative medicine and tissue engineering. This therapy in particular can be an alternative agent to prevent Alopecia-like. Previous studies reported several studies that proved the benefits of stem cells against alopecia. The purpose of this work is to demonstrate the impact of SH-MSCs during gel formation on the PDGF and IL-1 $\beta$  gene expression in rat skin that has been given fluconazole-induced alopecia.

**Methods:** Investigation using a post-test control group structure. Fluconazole was administered to groups of healthy rats, positive control, and control using topical gel-based SH-MSCs. While healthy rats did not receive exposure to fluconazole. For seven days, the groups received topical gel containing 10% and 20% SH-MSCs at a dose of 200 mg/mouse/day; the control group was given the gel basis. On day 14, termination was carried out, and qRT-PCR was used to analyze the expression of PDGF and IL-1 $\beta$ . One way ANOVA with the post hoc LSD test was used to statistically analyze differences between treatment groups.

**Results:** Analysis of PDGF gene expression in K3 (0.806 + 0.12) and K4 (1.71 + 0.31) was higher than the control group. While IL-1 $\beta$  in K3 (2.71 + 0.23) and K4 (1.41 + 0.20) fell in relation to the control group as the concentration of SH-MSCs increased.

**Conclusions:** The delivery of SH-MSCs gel has a major impact on how quickly PDGF expression rises and IL-1 $\beta$  expression falls.

Keywords: alopecia-like, IL-1 $\beta$ , PDGF and SH-MSCs,

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar belakang

Kondisi yang ditandai dengan kerontokan rambut secara tiba-tiba di kulit kepala dan disebabkan oleh penggunaan narkoba disebut *Alopecia-like*.<sup>1</sup> Interleukin 1  $\beta$  (IL- 1 $\beta$ ) merupakan sitokin penginduksi yang sangat kuat terhadap rambut rontok dan penghambat pertumbuhan rambut manusia yang signifikan.<sup>2</sup> Kadar *pean Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) yang menurun bisa menyebabkan *alopecia – like* . Satu dari sejumlah agen penyebab *alopecia - like* adalah *fluconazole*. Obat *fluconazole* dan *triazole* menunjukkan interaksi dengan sistem P-450.<sup>2</sup> Katalis pengoksidasi dalam metabolisme asam lemak, xenobiotik, obat-obatan, racun, dan karsinogen ialah P-450 yakni suatu enzim tipe hemeprotein. *Fluconazole* dosis tinggi menyebabkan peningkatan kadar retinoid endogen dan dapat membuat kerontokan rambut yang reversible.<sup>3</sup>

*Alopecia* sulit diobati, saat ini. Pengobatan seperti pemberian *platelet rich plasma* (PRP), *growth factor for hair*, *minoksidil 2,5 – 5%* dan *finasteride* hanya bersifat sementara sehingga tidak kunjung sembuh, maka dari itu dibutuhkan terapi alternatif yang lebih efektif. Rekurensi *alopecia* (kerontokan rambut) setelah perawatan PRP dapat terjadi karena beberapa alasan, meskipun ada respon positif pada awalnya. Alasan mendasarnya ialah PRP menargetkan elemen lokal yang dapat meningkatkan pertumbuhan rambut, seperti mengaktifkan folikel rambut dan meningkatkan aliran darah kulit kepala. Namun, banyak jenis *alopecia*

memiliki penyebab genetik, hormonal, atau yang berhubungan dengan kekebalan tubuh yang berkontribusi terhadap kerontokan rambut. PRP mungkin tidak dapat mengatasi penyebab utama ini, yang menyebabkan kerontokan rambut terus berlanjut dari waktu ke waktu. Pendekatan terapi alternatif yang efektif dan aman salah satunya adalah pemberian *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH - MSCs).<sup>1,2</sup> Keuntungan utama SH-MSCs dibandingkan senyawa lain yang telah dibuktikan termasuk kurangnya imunogenisitas biomolekul aktifnya, kurangnya efek samping, dan kemudahan penyerapan melalui pelindung kulit dan ke dalam dermis karena ukuran molekulnya yang kecil.<sup>4,5</sup> *Secretome* bekerja paling baik bila diberikan sebagai sediaan gel topikal yang mengandung 10% dan 20% SH-MSCs, diberikan dengan dosis harian 200 mg per tikus. Data terkait pemberian SH – MSCs pada penderita *alopecia – like* masih langka sehingga penting dilakukan penelitian.<sup>6</sup>

Studi mengenai epidemiologi *alopecia* menunjukkan bahwa *alopecia* mempengaruhi pria dan wanita. 20 juta dari 50 juta orang Amerika yang menderita *alopecia* ialah perempuan. Dibandingkan dengan wanita, *alopecia* lebih sering terjadi pada pria. Pada pria berusia 30 -50 tahun, *alopecia* sering terjadi (30–50%).<sup>7</sup> Lebih dari 50% wanita > 79 tahun menderita *alopecia*, disebut juga sebagai *female pattern hair loss* (FPHL). *Alopecia areata* ialah penyebab utama kerontokan rambut, yang mempengaruhi 2% populasi Amerika secara keseluruhan. Penyebab paling umum kerontokan rambut pada anak ialah *tinea capitis*.<sup>3</sup> Belum pernah dilakukan studi mengenai data epidemiologi mengenai kejadian umum rambut rontok di Indonesia. *Alopecia areata* menyumbang 39,7%



dari seluruh kasus kerontokan rambut dalam kajian pada 116 pasien di klinik kulit dan kelamin Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo. *Telogen effluvium* (34,5%) dan *androgenetic alopecia* (11,2%) ialah jenis rambut rontok paling umum berikutnya.<sup>6,8</sup>

Penelitian *in vitro* yang dilakukan Hoffman dkk. telah menunjukkan siklus rambut *murine*, IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  meningkat tajam dengan dimulainya fase katagen spontan. Fase katagen dikenal sebagai fase transisi pada proses alopecia. Fase ini relatif singkat dan berlangsung selama beberapa minggu. Selama fase katagen, folikel rambut terlepas dari suplai darah dan menyusut. Hal ini menyebabkan bagian bawah folikel rambut (buluh) bergerak lebih dekat ke permukaan kulit. Sementara siklus memuncak selama fase telogen dan berhubungan dengan peningkatan ekspresi transduksi sinyal reseptor IL-1 tipe I.<sup>8</sup> Penelitian terdahulu mengenai tikus transgenik menunjukkan bahwa ekspresi gen IL-1 secara berlebihan pada epidermis memiliki hubungan dengan kerontokan rambut yang tidak merata yang menyerupai *alopecia areata*. Daerah kulit kepala manusia yang terkena *alopecia areata* dan terjadinya ekspresi gen IL-1 $\beta$  yang berlebihan terdeteksi terutama pada tahap awal penyakit, sementara kerentanan terhadap penyakit dan keparahan ditentukan oleh reseptor polimorfisme IL-1- antagonis dan IL-1a.<sup>6,7</sup> Beberapa faktor pertumbuhan berperan dalam pertumbuhan dan pemeliharaan folikel adalah PDGF untuk merangsang mitosis sel punca untuk mengaktifkan papila dermal dan menghambat apoptosis selama siklus sel kemudian membantu membentuk mikrosirkulasi. Mekanisme yang mungkin dalam pertumbuhan rambut adalah pelepasan PDGF melalui aktivasi platelet dan

mekanisme regenerasi luka, aktivasi sel punca folikel selama penyembuhan luka dan overekspresi.<sup>7,9</sup>

*Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) banyak digunakan dalam rekayasa jaringan dan kedokteran regeneratif. Terapi *stem cell* telah berkembang menjadi pilihan yang menarik untuk mengurangi kebutuhan keseluruhan untuk transplantasi jaringan dan meminimalkan waktu tunggu pasien. Banyak penelitian klinis telah menunjukkan bahwa pemanfaatan *stem cell* adalah aman dan merupakan pendekatan terapeutik yang menjanjikan.<sup>10</sup> *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) secara khusus dapat menjadi agen alternatif untuk mencegah *Alopecia-like*.<sup>11</sup> Penelitian terdahulu melaporkan beberapa penelitian yang membuktikan manfaat *stem cell* terhadap *alopecia*<sup>11</sup> namun belum ada penelitian terkait pengaruh SH-MSCs pada ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan PDGF pada *alopecia*. Studi ini bermaksud guna membuktikan dampak SH-MSCs dalam sediaan gel pada ekspresi gen PDGF dan IL-1 $\beta$  kulit tikus model *Alopecia – like* yang diinduksi *fluconazole* secara *in vivo*.

## 1.2. Rumusan Masalah

Studi ini menyajikan rumusan masalah, yakni: "Apakah terdapat pengaruh gel SH-MSCs terhadap ekspresi gen PDGF dan IL-1 $\beta$  pada tikus model *Alopecia-like*?"

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Guna mengungkap dampak gel SH-MSCs akan ekspresi gen PDGF serta IL-1 $\beta$  pada tikus model *Alopecia - like*.

### 1.3.2. Tujuan Khusus

1. Guna mengungkap perubahan ekspresi gen PDGF pada tikus model *alopecia - like* yang diberi gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200mg/tikus/hari antar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Guna mengungkap perubahan ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada tikus model *alopecia - like* yang diberi gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200mg/tikus/hari antar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

### 1.4. Manfaat penelitian

#### 1.4.1. Manfaat Teoritis

penyediaan data ilmiah mengenai dampak SH-MSCs sebagai agen regeneratif dalam bidang kedokteran yang dapat membantu mengatasi *alopecia-like*.

#### 1.4.2. Manfaat Praktis

1. Studi ini mengungkapkan seperti apa SH-MSCs dapat secara efektif mencegah photoaging dan perbaikan *alopecia-like*.
2. Masyarakat dapat mengetahui lebih jauh temuan studi ini mengenai dampak SH-MSCs pada *alopecia-like* dan perbaikan/regenerasi kulit. Studi tambahan dapat diterapkan di masyarakat.

### 1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas penelitian

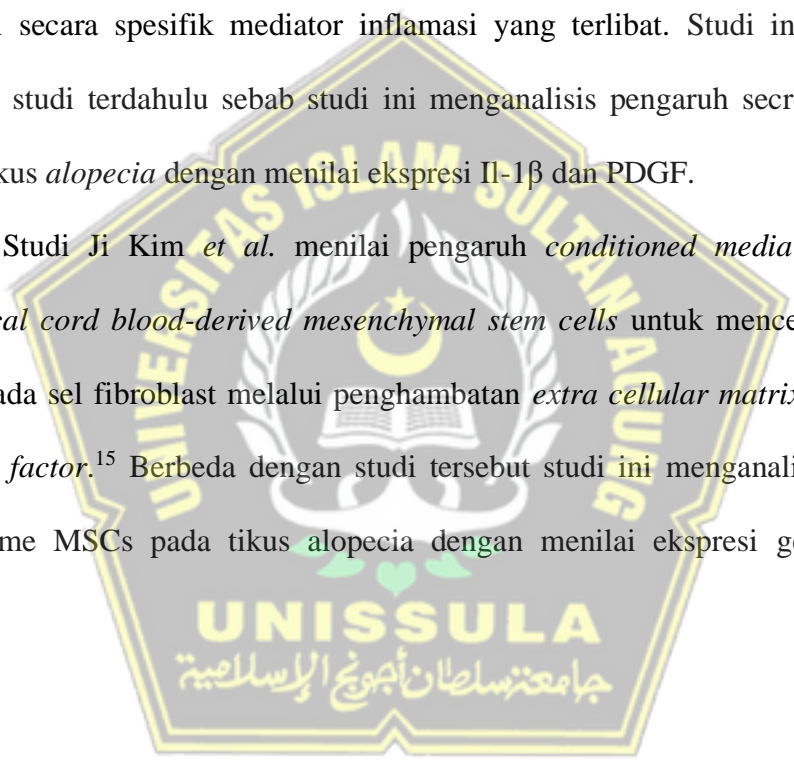
Peneliti	Judul	Metode	Kesimpulan
Seok-Yong Ahn, Long-Quan Pi.,	<i>Effect of IGF-I on Hair Growth Is Related to</i>	In Vitro, eksperimental	Pada folikel rambut manusia yang dikultur

Peneliti	Judul	Metode	Kesimpulan
Sungjoo Tommy Hwang, Won-Soo Lee. <sup>12</sup>	<i>the Anti-Apoptotic Effect of IGF-I and Up-Regulation of PDGF-A and PDGF-B</i>		ditemukan bahwa IGF-I memiliki efek positif pada laju pertumbuhan rambut linier. IGF-I mempertahankan fase anagen
Andrey Ratushnyy , Mariia Ezbekova and Ludmila Buravkova <sup>13</sup>	<i>Secretome of Senescent Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Negatively Regulates Angiogenesis</i>	In Vivo, eksperimental	Penurunan potensial angiogenik dari penuaan Sekret ASC in ovo. Sejumlah protein terkait angiogenesis menunjukkan peningkatan conditioned medium (CM) setelah budidaya jangka panjang.
John P. Cole <sup>1</sup> , Megan A. Cole <sup>1</sup> , Chiara Insalaco, Valerio Cervelli, Pietro Gentile <sup>14</sup>	<i>Alopecia and platelet-derived therapies</i>	In Vitro, eksperimental	PRP tetap menjadi terapi rambut rontok yang menjanjikan dan harus dievaluasi lebih lanjut untuk digunakan tidak hanya sebagai alat terapi independen, tetapi juga sebagai pengobatan untuk menambah prosedur bedah.
Yoon-Ji Kim, Dong Hee Seo, Seung Hee Lee, Sung-Hoon Lee, Geun-Ho An, Hee-Jin Ahn, Daeken Kwon, Kwang-Won Seo, Kyung-Sun Kang, <sup>15</sup>	<i>Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin</i>	In Vitro, Eksperimental	<i>Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells</i> meningkatkan dermal density melalui stimulasi growth factor dan <i>extracellular matrix</i> .

Pada penelitian Seok-Yong Ahn, et al menjelaskan pengaruh anti apoptotic terhadap pertumbuhan rambut yang dipengaruhi IGF-1, Penelitian ini tersebut juga menyelidiki hubungan antara IGF-I dan berbagai faktor lain (yaitu molekul terkait apoptosis, sitokin pro-inflamasi, faktor pertumbuhan lainnya) di kontrol

pertumbuhan HF. Penelitian Ratushnyy, et al menilai pengaruh angiogenik MSCs turunan adiposa terhadap media terkondisi (CM) dan chorioallantoic membran (CAM) in vivo menggunakan embrio puyuh Jepang. Studi ini tidak sama dengan dua studi terdahulu sebab studi ini menganalisis pengaruh secretome MSCs pada tikus *alopecia* dengan menilai ekspresi gen Il-1 $\beta$  dan PDGF. Penelitian Colel JP menjelaskan hubungan *platelet-derived therapies terhadap alopecia*, namun tidak menilai secara spesifik mediator inflamasi yang terlibat. Studi ini tidak sama dengan studi terdahulu sebab studi ini menganalisis pengaruh secretome MSCs pada tikus *alopecia* dengan menilai ekspresi Il-1 $\beta$  dan PDGF.

Studi Ji Kim *et al.* menilai pengaruh *conditioned media* dari *human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells* untuk mencegah penuaan kulit pada sel fibroblast melalui penghambatan *extra cellular matrix* dan induksi *growth factor*.<sup>15</sup> Berbeda dengan studi tersebut studi ini menganalisis pengaruh secretome MSCs pada tikus *alopecia* dengan menilai ekspresi gen Il-1 $\beta$  dan PDGF.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Alopecia -like

##### 2.1.1. Definisi

Penyakit yang dikenal sebagai penyakit *alopecia-like* ini ditandai dengan hilangnya rambut kulit kepala secara tiba-tiba. Gejala *alopecia-like* dapat menyerang siapa saja, tanpa memandang usia, jenis kelamin, atau jenis rambut, dan dapat menyerang orang dewasa maupun anak-anak. *Alopecia areata* ialah gangguan autoimun yang menyebabkan kerontokan rambut sirkular secara tiba-tiba. Hal ini dimediasi oleh berbagai sitokin, termasuk TNF, PDGF, IL-1 $\beta$ , dan sel limfosit T. Sitokin ini menghasilkan proses inflamasi pada folikel rambut. Kerontokan rambut ini bersifat berulang dan kronis.<sup>16,17</sup> Kondisi *alopecia-like* tidak dapat diprediksi, dengan gambaran histologis yang berbeda pada setiap tahap. Etiopatogenesis *Alopecia-like* telah menjadi subyek banyak gagasan, mulai dari disfungsi sistem kekebalan hingga teori genetik dan perkembangan autoantigen tertentu. Menurut temuan studi saat ini, interaksi antara faktor keturunan dan faktor pemicu lingkungan menentukan timbulnya dan tingkat keparahan penyakit *alopecia-like*. Hipotesis *alopecia-like* saat ini berpusat pada presentasi *self-antigen* yang memicu aktivasi limfosit dan kerusakan status *immune priviledge* folikel rambut.<sup>17,18</sup>

*Alopecia-like* terjadi pada 2% dari total populasi. Menurut sebuah studi, 25% kasus *alopecia-like* dengan *alopecia*, dengan kebanyakan orang berusia

antara 30 dan 59 tahun. Semua bagian tubuh dapat memiliki gejala *alopecia-like*, namun kulit kepala mendominasi 90% atas kasus yang dilaporkan. Sebanyak 338 pasien baru *alopecia* didaftarkan di Unit Rawat Jalan (URJ) Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya periode Januari 2010 hingga Oktober 2013 menurut data kunjungan rawat jalan.<sup>19,20</sup>

### 2.1.2. Proses *Alopecia-like*

*Alopecia-like* dapat berkembang menjadi bentuk yang lebih parah, seperti *alopecia universalis* (AU), yakni hilangnya seluruh rambut di tubuh, dan *alopecia totalis* (AT), yakni hilangnya seluruh rambut di kulit kepala. Sekitar 5% pasien AA akan mengalami AU atau AT. Meskipun dapat disembuhkan, *alopecia* dapat muncul kembali dengan cepat, membuat penyakit ini sangat tidak terduga dan mengganggu emosi meskipun tidak mengancam jiwa.<sup>21,22</sup> Dengan bukti klinis, tampaknya ada korelasi antara terjadinya penyakit *Alopecia-like* dan berbagai kelainan autoimun, termasuk vitiligo (4%) dan lupus eritematosus sistemik (0,6%), serta penyakit tiroid (8-28%). Gejala *alopecia-like* juga berkaitan dengan keadaan psikologis seseorang, terutama pada saat stres dan kecemasan. Kualitas hidup pasien sangat dipengaruhi oleh hasil, efek samping, dan kambuhnya kondisi *alopecia-like*.<sup>22,23</sup>

Dapat diyakini bahwa respons autoimun yang disebabkan oleh berbagai penyebab, termasuk faktor genetik, fisik, emosional, sosial, dan lingkungan, terkait erat dengan proses yang menyebabkan gejala *alopecia-like*.<sup>24,25</sup> Meskipun AA dapat menurunkan rasa percaya diri dan kualitas hidup pasien,

indikasi klinis AA terkadang disepelekan dan dianggap hanya sekedar masalah kosmetik. Meskipun pemeriksaan fisik dan dermoskopi merupakan metode yang relatif sederhana untuk mendiagnosis AA, pengobatan pasien AA biasanya sulit.<sup>26</sup> Terapi berpengaruh kecil pada perkembangan kondisi penyakit; yang dilakukannya hanyalah mendorong pertumbuhan rambut baru.<sup>7</sup> Pasien dengan gejala *alopecia-like* dapat memperoleh manfaat dari suntikan kortikosteroid intralesi, imunomodulator, kortikosteroid topikal, dan terapi *stem cell*.<sup>8</sup> Walau demikian, tingkat remisi spontan masih tinggi, dan terapi yang ada saat ini tidak selalu memberikan hasil terbaik.<sup>27</sup>

### 2.1.3 Faktor Risiko Alopecia

Ada beberapa faktor yang dapat menyebabkan *alopecia-like*. Faktor tersebut antara lain:

#### 1. Faktor Genetik

Sebab kelainan HLA 22 sering dijumpai di Israel, gangguan ini sering diklaim sebagai penyakit rasial Yahudi. *Alopecia* umum terjadi di Irlandia, begitu pula dengan adanya kelainan HLA B 12. Demikian pula, *alopecia* dapat terjadi di tempat yang sama pada kembar identik pada waktu yang sama.<sup>7,9</sup>

#### 2. Faktor Immunologik

Dua mekanisme yang terdiri atas, tipe autoimun dan tipe atopik membantu menjelaskan fungsi imunologi. Meskipun diagnosis nya masih bervariasi dengan karakteristik yang berbeda, terdapat laporan korelasi kuat antara tipe atopik dan *alopecia* pada sejumlah populasi. Ditemukan bahwa eksema dan



asma mempengaruhi 18% anak-anak penderita *alopecia*. Faktanya, remaja penderita asma menyumbang 9% dari kasus *alopecia* di Amerika Serikat.<sup>8</sup>

Telah lama diketahui bahwa kebotakan berkaitan dengan penyakit autoimun dan kelainan endokrin tertentu. *Alopecia* biasanya muncul antara 2,8% dan 8% dan berkaitan dengan penyakit tiroid Hashimoto. Hingga 4% kasus vitiligo disebabkan oleh penyakit autoimun, dan gangguan ini mungkin berhubungan dengan kebotakan. *Alopecia* juga dikaitkan dengan penyakit Addison dan anemia pernisiiosa.<sup>8,9</sup> Sejumlah studi berspekulasi bahwa autoantibodi berperan dan diproduksi melawan sel matriks. Dipercayai bahwa *alopecia* ialah defisiensi respon imun karena terdapat penurunan sel T yang terkait dengan kondisi tersebut.

### 3. Faktor Endokrin

Tiroksin, kortikosteroid, estrogen, dan androgen ialah sejumlah hormon yang memengaruhi perkembangan rambut. Hormon androgen mempunyai kemampuan menebalkan rambut, mempercepat pertumbuhan, dan memperbesar folikel rambut. Pada pria dan wanita tertentu, daerah bitemporal pada kulit kepala merupakan tempat hormon androgen berperan mengurangi diameter batang rambut dan memperpendek durasi fase anagen. Hirsutisme pada wanita biasanya disebabkan oleh aktivitas androgen. Secara genetik, androgen melepaskan mitogen yang, bergantung pada reaksi organ target, dapat mempercepat atau memperlambat perkembangan rambut. Sementara itu, fase anagen diperpanjang dan pertumbuhan rambut diperlambat oleh hormon estrogen.<sup>6</sup>

## 2.2 Cytokine pada Alopecia

### 2.2.1 *Interleukin-1 $\beta$* (IL-1 $\beta$ )

#### 1. Definisi

*Interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ) mengacu pada sekelompok sitokin pro-inflamasi sebagai pemeran utama dalam sistem kekebalan tubuh. Interleukin 1 $\beta$  diproduksi oleh bermacam-macam sel kekebalan, seperti sel dendritik, makrofag, dan monosit, serta jenis sel lainnya, termasuk sel epitel dan fibroblas. Terdapat dua bentuk utama IL-1 $\beta$ : IL-1 $\alpha$  (interleukin-1 alfa) dan IL-1 $\beta$  (interleukin-1 beta). Baik IL-1 $\alpha$  maupun IL-1 $\beta$  adalah mediator pro-inflamasi kuat yang bertindak sebagai molekul pemberi sinyal yang terlibat dalam mengatur respons imun, peradangan, dan pertahanan dalam tubuh.<sup>12</sup>

*Interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ) memberikan efeknya dengan mengikat reseptor permukaan sel tertentu yang disebut reseptor IL-1 $\beta$  (IL-1R). Setelah berikatan, IL-1 $\beta$  mengaktifkan jalur pensinyalan hilir, yang mengarah pada produksi berbagai sitokin lain, seperti IL-6 dan TNF- $\alpha$ , serta perekrutan dan aktivasi sel kekebalan. IL-1 $\beta$  terlibat dalam berbagai proses fisiologis dan patologis, termasuk demam, peradangan, perbaikan jaringan, dan regulasi respons imun adaptif. Disregulasi sinyal IL-1 $\beta$  telah terlibat dalam berbagai penyakit, termasuk gangguan autoimun, peradangan kronis, dan beberapa jenis kanker. Akibatnya, IL-1 $\beta$  telah menjadi target intervensi terapeutik, dan obat-obatan yang memblokir aktivitas IL-1 $\beta$  telah dikembangkan untuk pengobatan kondisi peradangan tertentu.<sup>13,14</sup>

## 2. Peran Interleukin-1 $\beta$ terhadap *Alopecia – like* .

Interleukin-1 $\beta$  adalah sitokin proinflamasi yang sangat tinggi untuk mendorong aktivasi limfosit-T, neutrophil dan makrofag ke jaringan yang mengalami inflamasi. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  juga diketahui memiliki efek penghambatan pada pertumbuhan rambut secara *in vitro*. Dosis penghambatan dari ketiga sitokin ini memiliki efek yang sama pada morfologi folikel rambut eksplan yang dikultur yang dihasilkan dalam pola anagen distrofi, yang ditandai dengan kon densifikasi papilla dermal dengan gangguan dan keratinisasi abnormal dari sel-sel perikortikal matriks rambut.<sup>14</sup> Fitur-fitur ini mirip dengan folikel patologi *alopecia areata* dan oleh karena itu gen untuk sitokin ini adalah gen kandidat dalam *alopecia areata*.<sup>15</sup>

### 2.2.2 Platelet derived Growth Factor (PDGF)

#### 1. Definisi

*Platelet derived Growth Factor* (PDGF) ialah protein yang berperan utama dalam pertumbuhan, pembelahan, serta penyembuhan luka. PDGF terutama dilepaskan oleh trombosit darah, serta jenis sel lain seperti sel otot polos, sel endotel dan makrofag. PDGF adalah sebagai protein dimer yang terdiri dari dua subunit yang identik atau serupa, yang dikenal sebagai rantai A (PDGF-A) atau rantai B (PDGF-B). Kombinasi yang berbeda dari subunit ini dapat membentuk lima isoform yang berbeda: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, dan PDGF-DD. Isoform ini berikatan dengan reseptor permukaan sel spesifik yang disebut reseptor PDGF (PDGFR), yang terdapat pada berbagai jenis sel.<sup>28,29</sup>

Ketika PDGF berikatan dengan reseptornya, PDGF memicu kaskade pensinyalan di dalam sel, yang mengarah pada respons seluler seperti pertumbuhan sel, proliferasi, migrasi, dan produksi komponen matriks ekstraseluler. *Platelet derivated Growth Factor* memainkan peran penting dalam pengembangan dan perbaikan jaringan, terutama dalam proses yang melibatkan penyembuhan luka, angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru), dan renovasi jaringan. Selain perannya dalam proses fisiologis normal, PDGF telah terlibat dalam berbagai kondisi patologis. Kelainan pada pensinyalan PDGF telah dikaitkan dengan penyakit seperti fibrosis, aterosklerosis, dan beberapa jenis kanker. Akibatnya, menargetkan PDGF atau reseptornya telah dieksplorasi sebagai strategi terapeutik dalam pengobatan kondisi ini. Secara keseluruhan, PDGF adalah faktor pertumbuhan penting yang terlibat dalam mengatur perilaku sel, perkembangan jaringan, dan penyembuhan luka, dan disregulasinya dapat memiliki implikasi yang signifikan bagi kesehatan manusia.<sup>29,30</sup>

## 2. Peran PDGF terhadap *alopecia* – like .

*Platelet derivated Growth Factor* (PDGF) telah terlibat dalam patogenesis dan pengobatan *alopecia* (kerontokan rambut) dalam konteks yang berbeda. Berikut adalah dua peran potensial PDGF dalam *alopecia* antara lain:<sup>31</sup>

- a. Pengembangan dan Pemeliharaan Folikel Rambut: PDGF berperan dalam pengembangan dan pemeliharaan folikel rambut. Selama

perkembangan embrionik, pensinyalan PDGF terlibat dalam pembentukan dan diferensiasi folikel rambut. Ini membantu mengatur proliferasi dan migrasi sel yang terlibat dalam perkembangan folikel rambut. Kasus *alopecia* seperti *alopecia* androgenetik (pola kerontokan rambut), miniaturisasi folikel rambut diamati. Penelitian telah menunjukkan bahwa PDGF dapat berperan dalam menghambat miniaturisasi folikel rambut dan meningkatkan pertumbuhan dan pemeliharaan folikel rambut. Dengan merangsang proliferasi sel dan mencegah apoptosis (kematian sel), pensinyalan PDGF dapat berkontribusi pada pemeliharaan folikel rambut yang sehat.<sup>31,32</sup>

- b. Penyembuhan Luka dan Regenerasi Jaringan: PDGF memiliki peran penting dalam penyembuhan luka, termasuk penyembuhan luka kulit yang mempengaruhi folikel rambut. Selama proses penyembuhan luka, PDGF dilepaskan oleh trombosit dan sel-sel lain untuk mendorong migrasi sel, proliferasi, dan perbaikan jaringan. PDGF membantu dalam menarik sel-sel kekebalan tubuh dan merangsang produksi pembuluh darah baru, yang sangat penting untuk memasok nutrisi dan oksigen ke jaringan yang sedang beregenerasi.<sup>31,32</sup>

Pada bentuk-bentuk *alopecia* tertentu, seperti *alopecia* areata, peradangan yang dimediasi oleh kekebalan tubuh mempengaruhi folikel rambut, yang menyebabkan kerontokan rambut. PDGF telah diselidiki sebagai agen terapeutik potensial dalam pengobatan *alopecia* areata dengan mendorong penyembuhan luka dan regenerasi jaringan pada folikel rambut

yang terkena. Penelitian telah menunjukkan bahwa perawatan berbasis PDGF, seperti terapi plasma kaya trombosit (PRP) yang mengandung PDGF, dapat merangsang pertumbuhan kembali rambut pada beberapa individu dengan *alopecia areata*. Penting untuk dicatat bahwa peran dan mekanisme PDGF yang tepat dalam berbagai jenis *alopecia* masih dipelajari, dan penelitian lebih lanjut diperlukan untuk sepenuhnya memahami dampak dan potensi aplikasi terapeutiknya.<sup>33,34</sup>

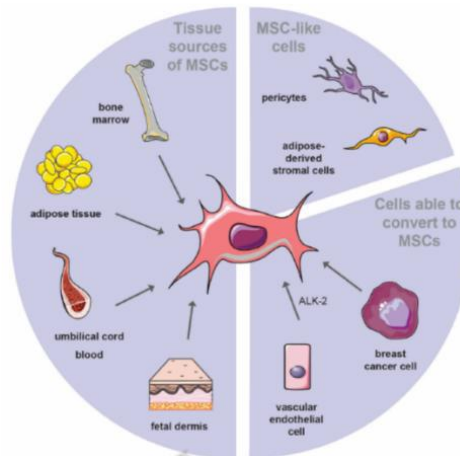
## 2.3 Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

### 2.3.1. Definisi

Sebab multipotensinya, *Mesenchymal stem cell* (MSCs) dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa yang berbeda seperti osteosit, sel adiposa, dan neurosit. Jaringan adiposa, folikel rambut, dan *Wharton Jelly* dari tali pusat merupakan sejumlah jaringan tempat sel induk mesenkim dapat diekstraksi. MSCs umumnya dikenal mirip dengan fibroblas atau sel jarum dan memiliki kemampuan untuk melekat pada permukaan plastik. Dalam hal karakteristik fenotipik, MSCs yang berasal dari tikus menunjukkan sifat osteogenik dan ekspresi beberapa penanda, seperti CD45 dan CD31, namun tidak memiliki sejumlah penanda tertentu, seperti CD44 dan CD29.<sup>35,36</sup>

### 2.3.2. Sumber MSCs

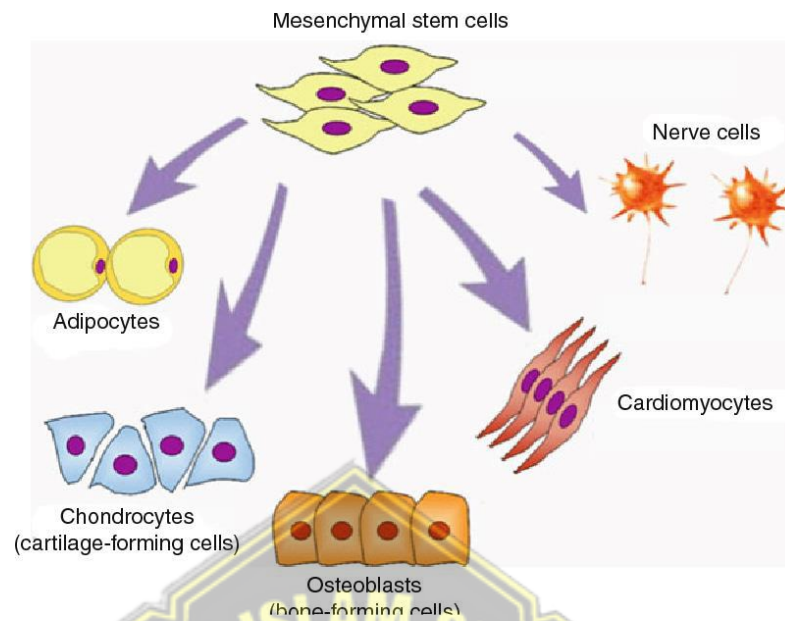
Sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta merupakan sejumlah jaringan tempat MSCs dapat diekstraksi.<sup>37,38</sup>



Gambar 2.1 Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs)<sup>39</sup>

### 2.3.3. Karakteristik MSCs

Di antara banyak sifat MSCs termasuk kapasitas *self renewal* dan kemampuan mereka untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa, termasuk tenosit, adiposit, kondrosit, osteoblas, dan miosis. Selain itu, karena MSCs dapat melepaskan berbagai sitokin pro dan antiinflamasi, MSCs juga dapat berfungsi sebagai imunomodulator. Maka sebab itu, MSCs menawarkan banyak manfaat dalam regenerasi kulit.<sup>40,41</sup>



Gambar 2.2 Kemampuan diferensiasi dari MSCs <sup>42</sup>

#### 2.3.4. Peran MSCs

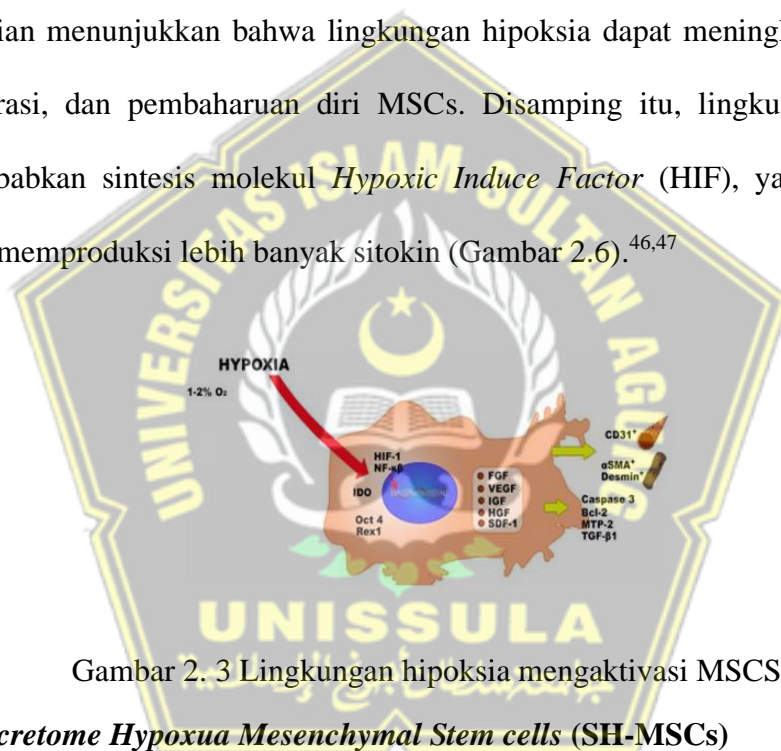
MSCs membantu proses regenerasi jaringan secara in-vivo. Kapasitas MSCs untuk membedakan dan mengendalikan sistem kekebalan tubuh terkait dengan fungsinya dalam regenerasi jaringan. Kapasitas MSCs untuk berdiferensiasi memungkinkan penggantian jaringan yang rusak.<sup>43,44</sup> Namun, kapasitas MSCs untuk bertransformasi menjadi MSCs tipe 2, yang bersifat anti-inflamasi atau MSCs tipe 1, yang bersifat pro-inflamasi, terkait dengan kapasitasnya sebagai imunoregulator. MSCs tipe 1 terlibat dalam memulai proses inflamasi, yang mendorong migrasi cepat berbagai konstituen inflamasi ke lokasi inflamasi. Dibandingkan dengan keadaan normal, hal ini menyebabkan proses inflamasi berlanjut lebih cepat. MSCs akan bertransisi menjadi MSCs tipe 2, yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kapasitas



untuk melepaskan sitokin yang membantu menghentikan proses inflamasi, setelah fase inflamasi selesai.<sup>45</sup>

## 2.4. Hipoksia

Ketika tidak ada pasokan oksigen ke jaringan, kondisi ini disebut hipoksia. Banyak tipe sel terkena dampak negatif dari hipoksia, dan hipoksia yang berkepanjangan dapat menyebabkan apoptosis sel. Meskipun demikian, sejumlah penelitian menunjukkan bahwa lingkungan hipoksia dapat meningkatkan adhesi, proliferasi, dan pembaharuan diri MSCs. Disamping itu, lingkungan hipoksia menyebabkan sintesis molekul *Hypoxic Induce Factor* (HIF), yang membantu MSCs memproduksi lebih banyak sitokin (Gambar 2.6).<sup>46,47</sup>



Gambar 2. 3 Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS<sup>47</sup>

## 2.5. *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem cells (SH-MSCs)*

Suatu sel yang unik karena sel ini memiliki sifat multipoten, pembaruan diri, plastisitas, dan sifat diferensiasi yang beragam disebut *Mesenchymal Stem cells* (MSCs). Paradigma baru saat ini tidak hanya menempatkan SH-MSCs sebagai jaringan pengganti, tetapi juga sebagai terapi Signalling cell yang fungsinya secara *in vivo* yang mengekspresikan secretome dengan mengeluarkan bahan faktor terlarut di area cedera dan inflamasi.<sup>8</sup> *Secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) mengeluarkan berbagai sitokin, termasuk IL-10, dan faktor

pertumbuhan, termasuk *transforming growth factor- $\beta$*  (PDGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), dan *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Penelitian telah menunjukkan bahwa (IL-1) merupakan penginduksi yang sangat kuat terhadap rambut rontok dan penghambat pertumbuhan rambut manusia yang signifikan.<sup>7</sup>

*Secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) dikenal karena kemampuannya melepaskan zat bioaktif yang dikenal sebagai sekretom. Hal ini dapat dikategorikan secara luas sebagai *growth factor* (GF), hormon, mediator lipid, sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, eksosom, mikrovesikel, agen anti-inflamasi, dll. Elemen-elemen ini dianggap sebagai pemain kunci dalam regenerasi dan perbaikan jaringan melalui sinyal sel-ke-sel yang dimediasi parakrin. TGF $\beta$  ialah salah satu sitokin yang berkontribusi terhadap pembaharuan kulit. TGF $\beta$  sangat penting untuk mengendalikan sintesis prokolagen I.<sup>4</sup> Aktivitas tirosinase dan enzim lain yang terlibat dalam jalur melanogenesis telah terbukti sangat berkurang oleh TGF $\beta$ , bersamaan dengan penghambatan pembentukan melanin yang signifikan. TGF $\beta$  juga menurunkan aktivitas MITF dan sintesis tirosinase, TRP-1, dan TRP-2, yang merupakan protein MITF. Selain itu, TGF $\beta$  menyebabkan *signaling pathway* ERK diaktifkan 4,73. Sebaliknya, TGF $\beta$  menghambat PKA, yang mengakibatkan inaktivasi MITF dan CREB. Konsentrasi IL-10 sekretom yang tinggi dapat mencegah pembentukan ROS, yang menurunkan inflamasi dan aktivasi p53.<sup>48,49</sup>

## 2.6 Pengaruh MSCs terhadap ekspresi gen PDGF dan IL-1 $\beta$

Prakondisi dengan hipoksia berdampak pada peningkatan kelangsungan hidup dan proliferasi MSCs. Dibandingkan dengan keadaan normal, MSCs hipoksia mengekspresikan tingkat molekul terlarut yang lebih tinggi seperti faktor pertumbuhan, kemokin, dan sitokin. Sitokin dan mediator berikut dikenal sebagai sekretom sel induk mesenkim hipoksia *Mesenchymal stem cells* (H-MSCs): IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, TNF, IGF-1, dan HGF. *Mesenchymal stem cells* (MSCs) mengirimkan sinyal dan pertumbuhan faktor PDGF oleh trombosit kemudian trombosit meningkatkan proliferasi sel untuk memperpanjang fase anagen. PDGF akan merangsang pengembangan folikel rambut dan menekan isyarat apoptosis. Pemberian HF-MSCs menunjukkan hasil yang lebih baik daripada pemberian PRP dengan frekuensi injeksi yang lebih rendah dan hasil pertumbuhan kembali rambut yang lebih banyak.<sup>50,51</sup>

Aktivitas enzim HF yang diinduksi oleh komponen PDGF di SH-MSCs mengaktifkan SHH dan LEF-1 sebagai sitokin, yang pada gilirannya mendorong pertumbuhan rambut. MSCs mengirimkan sinyal dan pertumbuhan faktor oleh trombosit kemudian trombosit meningkatkan proliferasi sel untuk memperpanjang fase anagen, merangsang pengembangan folikel rambut dan menekan apoptosis. SH-MSCs juga menekan sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  yang kemudian mengaktifkan HFSC untuk memperbaharui follicle rambut yang rusak dan juga mempertahankan morfologi rambut sehingga memungkinkan juga untuk mempertahankan regenerasi rambut.<sup>52,53</sup>

## BAB III

### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

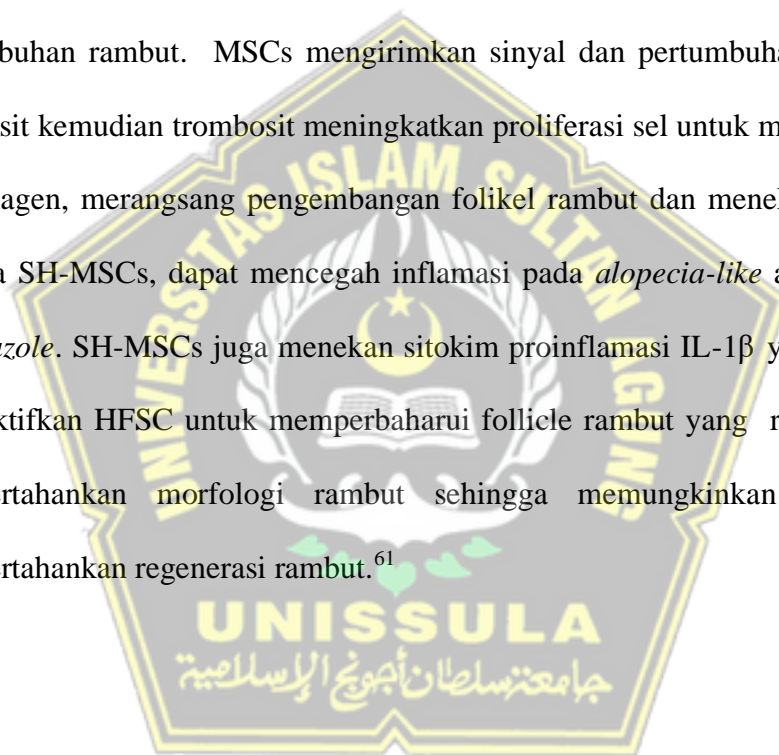
#### 3.1. Kerangka Teori

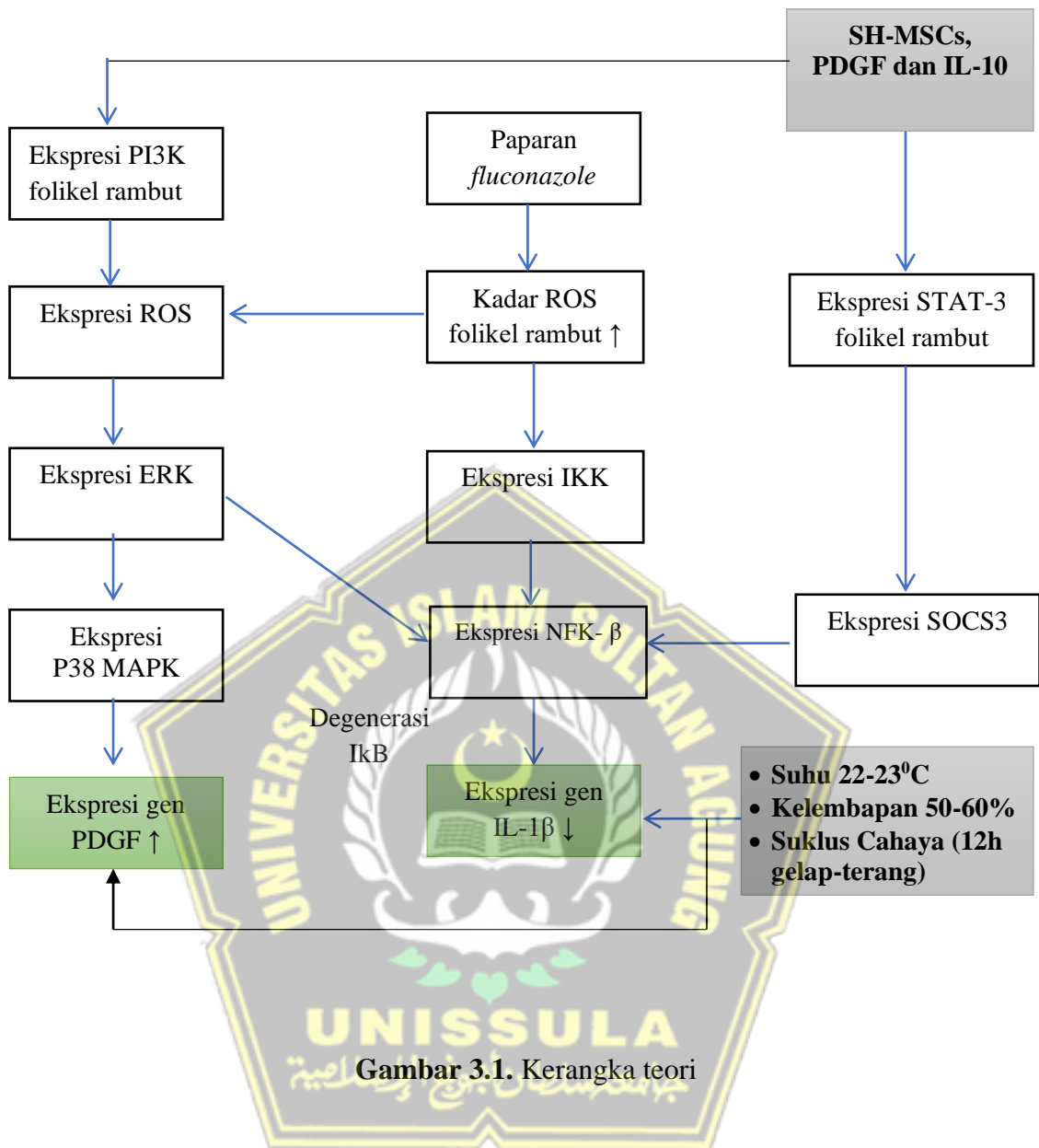
Peningkatan pembentukan ROS akibat paparan *fluconazole* akan memfosforilasi enzim I kappa  $\beta$  Kinase (IKK). IKK akan menjadi terfosforilasi akibat fosforilasi ini dan bergabung dengan subunit p50 dan p65 membentuk kompleks. Karena adanya ubiquitin, komponen ini akan mengakibatkan enzim IKK terdegradasi. Sehingga, saat memasuki nukleus, subunit p50/p65 akan memicu transkripsi sitokin inflamasi.<sup>56</sup> Ketika gel SH-MSCs diberikan, STAT3 akan terfosforilasi dan masuk ke dalam nukleus, di mana ia kemudian akan mulai mentranskripsi SOSC3. MAPK akan dipicu oleh SOSC3, meningkatkan aktivasi NF- $\kappa$ B. Pada akhirnya, transkripsi sitokin inflamasi seperti IL-1 $\beta$  akan ditekan oleh translokasi NF- $\kappa$ B di dalam nukleus. Aktivasi sitokin ini akan berdampak pada proses pertumbuhan rambut.<sup>57</sup>

Prakondisi dengan hipoksia berdampak pada peningkatan kelangsungan hidup dan proliferasi SH-MSCs. Dibandingkan keadaan normal, sekretom ini akan mengekspresikan molekul yang lebih larut seperti faktor pertumbuhan, kemokin, dan sitokin.<sup>58</sup> IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, TNF, IGF-1, dan HGF merupakan contoh sitokin dan mediator yang muncul sebagai respons terhadap hipoksia; ini dikenal sebagai SH-MSCs.<sup>59</sup> Di wilayah *alopecia-like*, *secretome* diaplikasikan secara topikal menggunakan pembawa matriks gel dalam penyelidikan ini. Selain mendorong pembentukan homodimer yang mentranslokasi ke dalam nukleus untuk menyertai

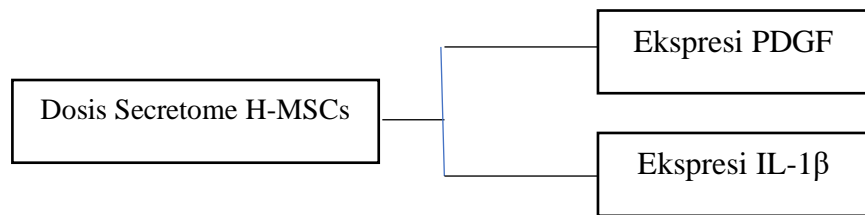
ekspresi gen sensitif STAT3, seperti SOSC3, aktivitas sekretom akan membantu pencegahan pembentukan ROS dan mengaktifkan fosforilasi STAT3. Selain itu, SOSC3 mencegah NF- $\kappa$ B diaktifkan dan ditranslokasi ke dalam nukleus, yang mencegah ekspresi gen pro-inflamasi IL-30 dan mengaktifkan PDGF.<sup>60,61</sup>

Aktivitas enzim HF yang diinduksi oleh komponen PDGF di SH-MSCs mengaktifkan SHH dan LEF-1 sebagai sitokin, yang pada gilirannya mendorong pertumbuhan rambut. MSCs mengirimkan sinyal dan pertumbuhan faktor oleh trombosit kemudian trombosit meningkatkan proliferasi sel untuk memperpanjang fase anagen, merangsang pengembangan folikel rambut dan menekan apoptosis. Adanya SH-MSCs, dapat mencegah inflamasi pada *alopecia-like* akibat paparan *fluconazole*. SH-MSCs juga menekan sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  yang kemudian mengaktifkan HFSC untuk memperbaharui folicle rambut yang rusak dan juga mempertahankan morfologi rambut sehingga memungkinkan juga untuk mempertahankan regenerasi rambut.<sup>61</sup>





**3.2. Kerangka Konsep**



**Gambar 3.1. Kerangka konsep**

### 3.3. Hipotesis

1. Adanya peningkatan ekspresi gen PDGF pada tikus model *alopecia - like* yang diberi gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan perbandingan dosis 200mg/tikus/hari antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.
2. Terdapat penurunan ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada tikus model *alopecia - like* yang diberi gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% yang diberi dosis 200mg/tikus/hari dengan perbandingan dosis 200mg/tikus/hari antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Studi ini menerapkan *post-test only control group design* dan merupakan kajian eksperimental *in vivo*. Subyek studi ialah tikus wistar jantan dengan berat badan antara 200 sampai 250 gram.

Berikut perlakuannya:

1. Kelompok 1 (K1) Tikus sehat (sebagian rambut pada punggung dicukur dan tidak diberi perlakuan khusus hanya diberikan NaCL 0.9%)
2. Kelompok 2 (K2) adalah Kelompok Kontrol (K) (tikus model *alopecia-like* akibat pemberian *fluconazole*)
3. Kelompok Tikus Model 1(K3) adalah tikus model *alopecia-like* dengan pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dengan dosis 200mg/tikus/hari.
4. Kelompok Tikus Model 2 (K4) adalah tikus model *alopecia-like* dengan pemberian gel gel topikal SH-MSCs 20% dengan dosis 200mg/tikus/hari.

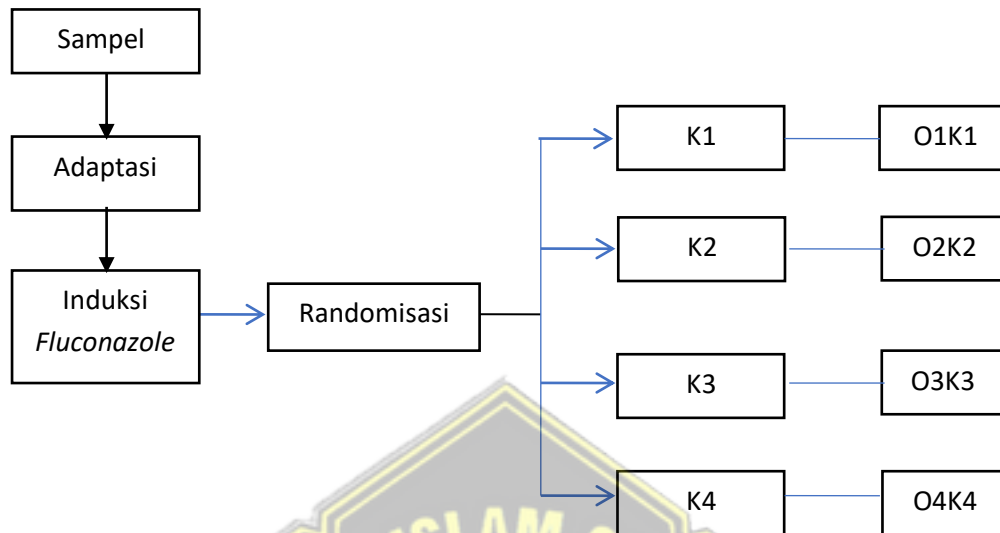
P : Perlakuan

A : Adaptasi

O: Observasi

R : Randomisasi





**Gambar 4.1.** Rancangan Penelitian

## 4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 4.2.1. Variabel Penelitian

#### 4.2.2.1. Variabel bebas

Gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200mg/tikus/hari ialah variabel bebas studi ini.

#### 4.2.2.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen PDGF dan IL-1 $\beta$  ialah variabel terikat pada studi ini.

### 4.2.2. Definisi Operasional

#### 4.2.2.1. Gel Sekretom hipoksia MSCs (SH-MSCs)

Vesikel ekstraseluler dan molekul larut yang dikenal sebagai sekretom disekresikan oleh SH-MSC. Zat aktif biologis termasuk kemokin, faktor pertumbuhan, dan sitokin ialah

contoh molekul yang dapat larut. Setelah menjalani prakondisi hipoksia SH-MSCs, media yang menghasilkan sekretom disaring menggunakan *Tangential Flow Filtration*. Selanjutnya, 0,1 gram gel berbasis dasar air dikombinasikan dengan SH-MSCs. Sekretom yang digunakan dalam basis gel dibagi menjadi dua kelompok: K4 menerima 10% SH-MSCs dan K3 menerima 5% SH-MSCs.

Satuan : %

#### 4.2.2.2. Ekspresi gen PDGF

Protein yang disebut *Platelet derived Growth Factor (PDGF)* sangat penting dalam penyembuhan luka, pertumbuhan, dan pembelahan. PDGF terutama dilepaskan oleh trombosit darah, serta jenis sel lain seperti makrofag.

Metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)* diterapkan guna mengekstraksi RNA dari sampel jaringan kulit di area *alopecia* untuk diperiksa. Hasilnya ditampilkan dalam bentuk persentase.

Skala: Rasio

#### 4.2.2.3. Ekspresi gen IL-1 $\beta$

Sitokin pro-inflamasi IL-1  $\beta$  terlibat dalam proses *alopecia-like*, yang menghambat pembentukan rambut baru. Metode *reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* diterapkan guna mengekstraksi RNA dari sampel jaringan

kulit di area *alopecia* untuk diperiksa. Hasilnya ditampilkan dalam bentuk persentase.

Skala: Rasio

### 4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

#### 4.3.1. Subyek Penelitian

Dokter hewan dari *Animal House Integrated Biomedical Laboratory* dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang menyetujui pemanfaatan tikus *Wistar* jantan berumur 2-3 bulan dengan berat 200-250 gram sebagai subjek kajian.

#### 4.3.2. Sampel Penelitian

##### 1. Kriteria Inklusi

Sampel studi dibatasi pada tikus *wistar* jantan yang berwarna putih dan memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. Berusia 2-3 tahun.
- b. Tikus pengidap *alopecia-like* yang terverifikasi
- c. Bobot badan 200-250 gram.

##### 2. Kriteria Eksklusi

Karakteristik tikus putih jantan galur *Wistar* ialah:

- a. Anatomis yang mengalami kelainan.
- b. Studi terdahulu telah memanfaatkannya.

#### 4. Kriteria *Drop Out*

Selama riset tikus mengalami kematian.

#### 4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Studi ini memanfaatkan metode *Randomized Sampling* dalam menghimpun sampel. Empat perlakuan diberikan pada tikus *Wistar* jantan:

Perlakuan K1 (tanpa perlakuan), K2 (hanya diberi paparan *fluconazole*), K3 (Pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dengan dosis 200mg/tikus/hari), dan K4 (Pemberian gel topikal SH-MSCs 20% dengan dosis 200mg/tikus/hari).

#### 4.3.4. Besar Sampel

Sesuai pedoman WHO, sampel yang ditentukan minimal lima sampel per kategori. Studi ini memanfaatkan 24 ekor tikus putih jantan strain *Wistar*, dengan 6 sampel tiap kelompok diambil menerapkan rumus sampel percobaan Federer 107:<sup>62,63</sup>

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

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

keterangan:

t = jumlah perlakuan

n = total sampel pada semua perlakuan

#### 4.4. Alat dan Bahan

##### 4.4.1. Alat

1. Perlengkapan kultur sel dimanfaatkan pada studi ini:

- Mikropipet
- Flask 75T.
- Inkubator CO<sub>2</sub>
- Dissecting kit
- *Biosafety Cabinet* (BSC)

2. Dengan pemanfaatan *hypoxic* kondisi kultur hipoksia diperoleh

3. *chamber*.

4. Guna mengukur kadar oksigen pada *hypoxic chamber* dimanfaatkan Oxygen meter.

5. Steril swab untuk mengoleskan gel SH-MSCs.

6. Alat yang dimanfaatkan guna mengkaji ekspresi gen PDGF dan IL-1 $\beta$ .

##### 4.4.2. Bahan

1. Bahan kajian ialah bahan kultur yang terbuat dari :

- Tali pusat tikus

- PBS
- NaCl 0.9%
- FBS
- Fungizone.
- Penstrep
- DMEM

2. Sementara itu, bahan-bahan yang dimanfaatkan pada perlakuan ialah:

- Gel berbasis air
- Xylasine
- PBS
- Ketamin
- Alkohol 70%

3. Disamping itu studi ini juga memanfaatkan *fluconazole* untuk menginduksi *alopecia-like* pada pungung tikus.

#### 4.5. Cara Penelitian

##### 4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

*Ethical clearance* Universitas Islam Sultan Agung Fakultas Kedokteran Semarang memberikan persetujuan atas studi ini.

##### 4.5.2. Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

Seluruh prosedur dilakukan di kabinet *biosafety* kelas 2 dengan tingkat sterilitas dan peralatan steril yang tinggi.<sup>64</sup>

1. Setelah dikumpulkan, *umbilical cord* dimasukkan ke dalam wadah steril yang diberi NaCl 0,9%.
2. Dengan menggunakan pinset, masukkan *umbilical cord* ke dalam cawan petri dan gunakan PBS untuk membersihkannya secara menyeluruh.
3. *Umbilical cord* janin tikus dipotong dan pembuluh darahnya dibuang.
4. Setelah *umbilical cord* dicincang halus, diletakkan secara merata di dalam labu 25T dan diamkan selama tiga menit agar tisu menempel pada permukaan labu.
5. Media (DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan sedikit demi sedikit hingga jaringan tertutup.
6. Eksplan disimpan dalam inkubator dengan 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C.
7. Setelah prosedur kultur dimulai, sel akan berkembang setelah sekitar 14 hari.
8. Setiap tiga hari, media diganti dengan cara membuang setengahnya dan menambahkan yang baru dan penuh sebagai gantinya.
9. Pemeliharaan sel berlanjut hingga 80% sel konfluensi.

#### 4.5.3. Proses Hipoksia<sup>65</sup>

1. MSCs dengan konfluensi 80% dimasukkan, dan ditambahkan hingga 10 mL media penuh.

2. Selanjutnya flask yang mengandung MSCs ditempatkan di dalam ruang hipoksia.
3. Dalam mengukur jumlah oksigen dalam ruangan, gas nitrogen dialirkan melalui katup inlet dan pengukur oksigen ditempatkan pada lubang sensor.
4. Nitrogen disuntikkan sampai oksigen 5% ditunjukkan oleh jarum indikator.
5. Chamber yang telah diisi flask diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Media kultur dikeluarkan setelah 24 jam dan disaring dengan TFT untuk menghasilkan SH-MSCs. Sel-sel tersebut kemudian dikombinasikan dengan gel berbasis dasar air pada kelompok K3 dan K4 sesuai dengan dosis.

#### 4.5.4. Pembuatan Sediaan Gel <sup>64,65</sup>

1. Dalam membuat sediaan gel, campurkan jumlah gel dengan sekretom pada K3 dan K4 sebagai berikut:
  - 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  $\mu$ L setara dengan 1 mg karena 1  $\mu$ L SH-MSCs dilarutkan dalam 1 mg NaCl.



- Penggunaan gel topical SH MSCs 100  $\mu$ L dan 200  $\mu$ L/kgBB pada tikus wistas jantan berat 200 gr, maka didapatkan dosis 20 $\mu$ L dan 40 $\mu$ L untuk masing-masing kelompok K3 dan K4.
  - Pembuatan sediaan gel SH-MSCs untuk K3 dilakukan dengan mencampurkan 20 mg larutan SH-MSCs ditambahkan 20 mg NaCl dan 160mg 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 ditambahkan 160 mg basis gel untuk mendapatkan total 200 mg gel dengan konsentrasi 20%.
2. Dalam kondisi aseptik, dilakukan pengadukan untuk menghasilkan campuran yang homogen berdasarkan ciri-ciri fisik yang terlihat di bawah mikroskop.



**Gambar 4. 2 (A) Base Gel (B) Gel Secretom**

#### 4.5.5. Pembuatan Alopesia dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Setelah satu minggu adaptasi, tikus diberikan kombinasi xylazine (20 mg/kgbb) dan ketamine (60 mg/kgbb) untuk menginduksi anestesi.
2. Bersihkan rambut pada punggung tikus.
3. *Fluconazole* dioleskan pada punggung tikus.
4. Tikus kelompok K1 tidak di berikan treatmen apapun.
5. Setelah itu, oleskan gel topikal yang terdiri dari 10% dan 20% gel topikal SH-MSCs dengan dosis 200 mg/mencit/hari selama 7 hari. Terapi gel basa diberikan pada hewan kontrol K2 negatif.

#### 4.5.6. Terminasi dan pengambilan jaringan<sup>66,67</sup>

1. Sebelum mengeluarkan organnya, matikan tikus dengan dosis koktail yang mematikan. Ketamine 60 mg/kgBB dan Xylazine 20 mg/kgBB diperlukan untuk membuat 10 mL cocktail.
2. Organ kulit diambil dari bangkai tikus dan diawetkan dalam RNA later pada suhu -80°C dalam cryotube bebas RNAase.

#### 4.5.7 Metode Validasi<sup>68</sup>

- Pemantauan makroskopis dengan menggunakan foto sampel dan mikroskopis dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE).
- Sampel kulit diperoleh dari masing-masing kelompok dan digunakan untuk membuat potongan histologis menggunakan pewarnaan HE dan teknik paraffin

- Sampel kulit tikus diperoleh dari masing-masing kelompok dan diawetkan dalam larutan NBF 10% atau *Neutral Buffer Formalin*.
- Sampel kulit dibersihkan dari sisa larutan fiksatif dengan membilasnya menggunakan alkohol 70%.
- Sampel ditandai dan ditempatkan dalam keranjang tisu setelah difiksasi dalam larutan BNF 10%.
- Alkohol absolut dan alkohol bergradasi 70, 80%, 90%, dan 96% digunakan untuk mendehidrasi sampel jaringan.
- Sampel dimasukkan ke dalam toluol selama satu jam, atau hingga menjadi bening atau transparan.
- Sampel kemudian diinfiltrasi menggunakan parafin dalam oven bersuhu 56°C. Caranya dengan memasukkannya ke dalam kombinasi toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Masing-masing selama tiga puluh menit, sampel kulit direndam dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III.
- Kemudian sampel ditanam (*embedding*) dalam parafin dan blocking ditunggu hingga paraffin mengeras.
- Dengan menggunakan mikrotom, potong blok jaringan menjadi irisan berukuran 6µm. Kemudian letakkan potongan-potongan tersebut di atas permukaan kaca yang telah dilapisi perekat Mayer Albumin, ditetesi sedikit air suling, dan dipanaskan di atas hot plate hingga menempel sempurna.

- Sebelum pewarnaan jaringan, parafin dihilangkan (deparaffinisasi) dengan xylol selama sehari penuh.
- Pewarna HE digunakan untuk pewarnaan. Kertas kering digunakan untuk menyerap kandungan xylol, yang kemudian secara bertahap ditambahkan ke air sulingan dan larutan alkohol dengan persentase yang semakin rendah (96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30% ), masing-masing, untuk durasi 1- 2 menit
- Setelah jaringan diwarnai selama 5–10 detik dengan hematoksilin, jaringan dibilas lagi selama 10 menit dengan air mengalir.
- Selama 3-5 menit, preparata direndam dalam alkohol masing-masing 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%.
- Selanjutnya jaringan diwarnai dengan pewarnaan eosin selama 2 menit. Kemudian dikeringkan dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam larutan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, dan 96%) masing-masing selama 3-5 menit.
- Setelah 15 menit *clearing* xylol, balsam Kanada diteteskan ke dalam sediaan histologi..
- Memasang slide jaringan dengan kaca penutup, memberi label, dan memasukkannya ke dalam kotak sediaan melengkapi prosedur ini.

#### 4.5.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA<sup>66</sup>

1. Sampel kulit dimasukan ke dalam tube berisi 300 uL RNA *later*, kemudian disimpan dalam suhu -20°C.

2. Sampel kulit sebanyak 50 mg lalu dimasukkan ke dalam tube berisi 1 mL Trizol, kemudian dilakukan proses homogenisasi menggunakan ultrasonikator serta diinkubasi di suhu ruang selama 5 menit.
3. Sampel ditambahkan dengan 0.2 mL kloroform dan pada suhu ruang sampel di inkubasi selama 2-3 menit.
4. Setelah itu sampel disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 12.000 x g.
5. Sampel akan membentuk tiga lapis larutan, sisi bawah berwarna merah muda berisi protein, sisi tengah berwarna putih asap berisi DNA dan sisi atas berwarna bening berisi RNA (*aqueous phase*). Pisahkan *aqueous phase* di sisi atas ke tube yang berbeda.
6. Sampel *aqueous phase* kemudian ditambahkan 0.5 mL isopropanol, kemudian diresuspensi, di inkubasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 x g pada suhu 4°C selama 10 menit.
7. Supernatant kemudian dibuang dan pellet ditambahkan dengan 1 mL 75% ethanol lalu diresuspensi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7500 x g di suhu 4°C selama 5 menit.
8. Supernatant kemudian dibuang dan pellet RNA ditambahkan dengan 50 uL *nuclease-free water* (NFW).
9. Konsentrasi sampel RNA kemudian dikuantifikasi menggunakan *uDrop microplate reader*.

10. Sampel RNA sebanyak 0.1 ug dalam 1 uL kemudian ditambahkan 5 uL NFW dan dilakukan proses denaturasi dengan inkubasi di suhu 65 °C selama 5 menit menggunakan *thermal cycler*.
11. Selama 5 menit dengan memanfaatkan *thermal cycler* sampel RNA kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C lalu ditambahkan 2 uL 4x DN Master Mix.
12. Selanjutnya ditambahkan 2 µL 5x RT Master Mix, dan *thermal cycler* dimanfaatkan guna menginkubasi campuran pada suhu 37°C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit, dan 98°C selama 5 menit.
13. Sampel cDNA kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

#### 4.5.9. Pembacaan IL1/PDGF dengan *Real Time-Polymerase Chain*

##### *Reaction (RT-PCR)*<sup>66,68</sup>

1. Dengan menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR), ekspresi gen IL-1β dan PDGF dianalisis.
2. Lalu proses mencampurkan 1 µL cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix sebanyak 10 µL, forward primer sebanyak 0.8 uL, reverse primer sebanyak 0.8 uL dan NFW 7.4 sebanyak uL.
3. Primer PDGF yang digunakan adalah F: 5'-TGC CAG AGC CTG CTC TTA AC-3' dan R: 5'GAT GCC ACG GAG ATA AGC GA-3'. Primer IL-1β yang digunakan adalah F: 5'-CGA CAG TGA GGA GAA TGA CC-3' dan R: 5'-CAC AGC CAC AAT GAG TGA CAC-3'.

4. Proses qPCR dilakukan menggunakan suhu 95 °C selama 2 menit, 95 °C selama 5 detik dan 56 °C selama 20 detik sebanyak 40 siklus. Proses qPCR dilakukan dengan menganalisis probe terhidrolisis pada panjang gelombang 520 nm.
5. Dengan Software EcoStudy kuantifikasi data qPCR dilakukan.

#### **4.6 Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **4.6.1 Tempat Penelitian**

Studi dilaksanakan di Universitas Islam Sultan Agung Fakultas Kedokteran Semarang dan laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)*.

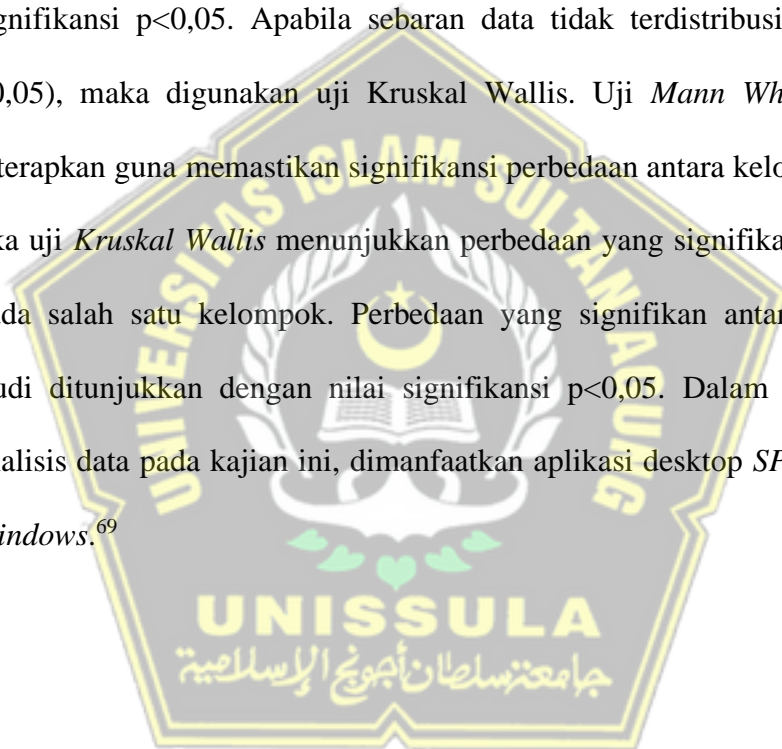
##### **4.6.2. Waktu Penelitian**

Bulan Juli – Agustus 2023, ialah waktu studi ini dilakukan.

#### **4.7 Analisa Data**

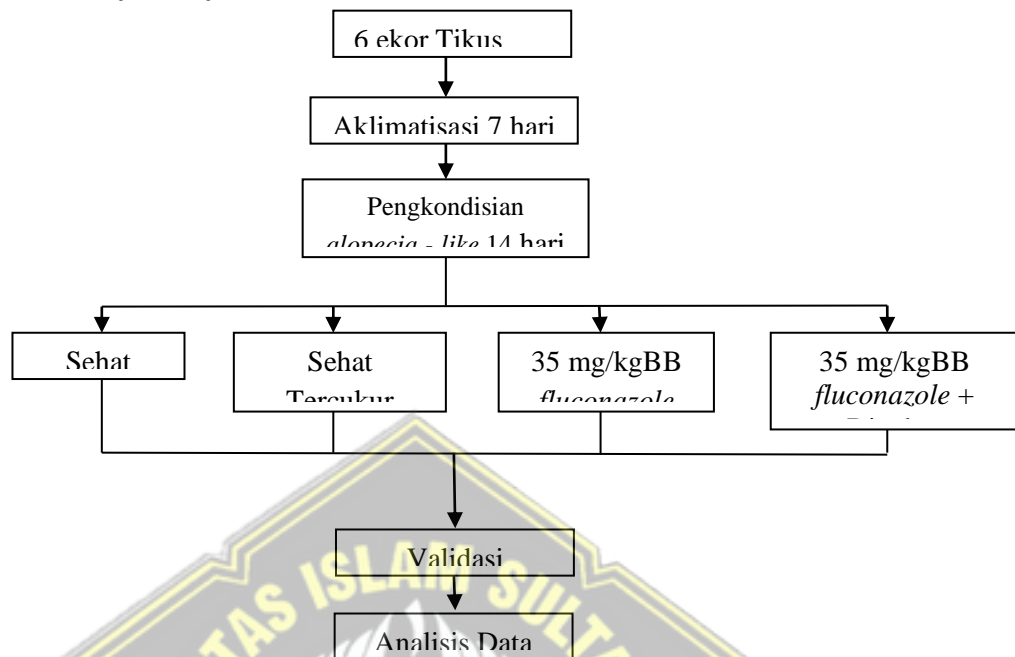
Selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif dengan menggunakan skala data rasio terhadap data yang dikumpulkan dari penelitian ini. Uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene* kemudian digunakan untuk menganalisis data normalitas dan varians. Uji beda *One Way Anova* dilakukan jika varian dan sebaran data normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ). Dalam memastikan signifikansi perbedaan antar kelompok studi, diterapkan uji *Post Hoc LSD* jika uji *One Way Anova* menghasilkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) pada salah satu kelompok. Perbedaan yang signifikan

antar kelompok penelitian ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$ . Uji beda *One Way Anova* dilakukan jika distribusi dan varians data normal ( $p > 0,05$ ) dan tidak homogen ( $p < 0,05$ ). Setelah dilakukan uji *One Way Anova*, jika terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) pada seluruh kelompok studi, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane*. Perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$ . Apabila sebaran data tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ), maka digunakan uji Kruskal Wallis. Uji *Mann Whitney* harus diterapkan guna memastikan signifikansi perbedaan antara kelompok studi jika uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) pada salah satu kelompok. Perbedaan yang signifikan antar kelompok studi ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$ . Dalam pengolahan analisis data pada kajian ini, dimanfaatkan aplikasi desktop *SPSS 26.0 for Windows*.<sup>69</sup>

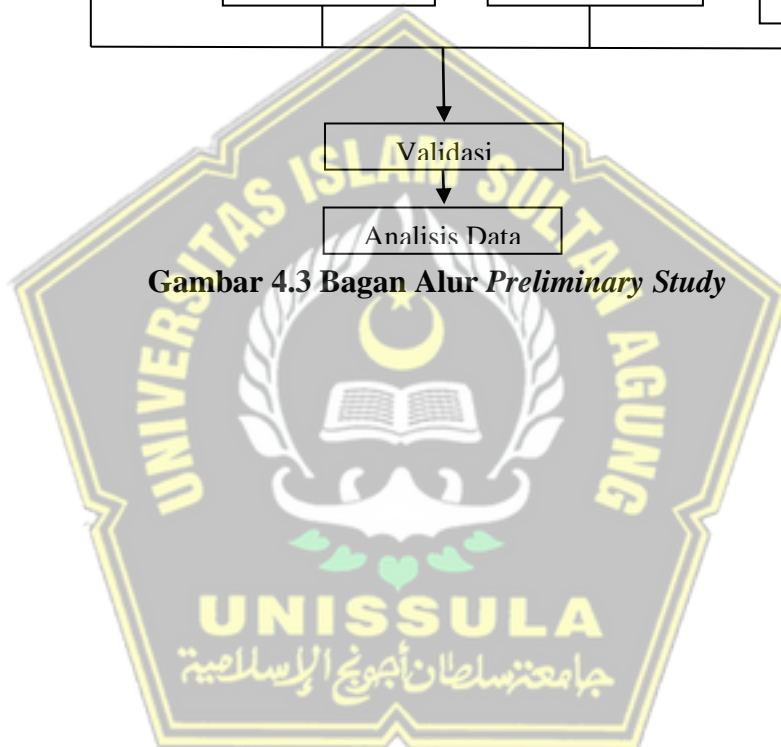




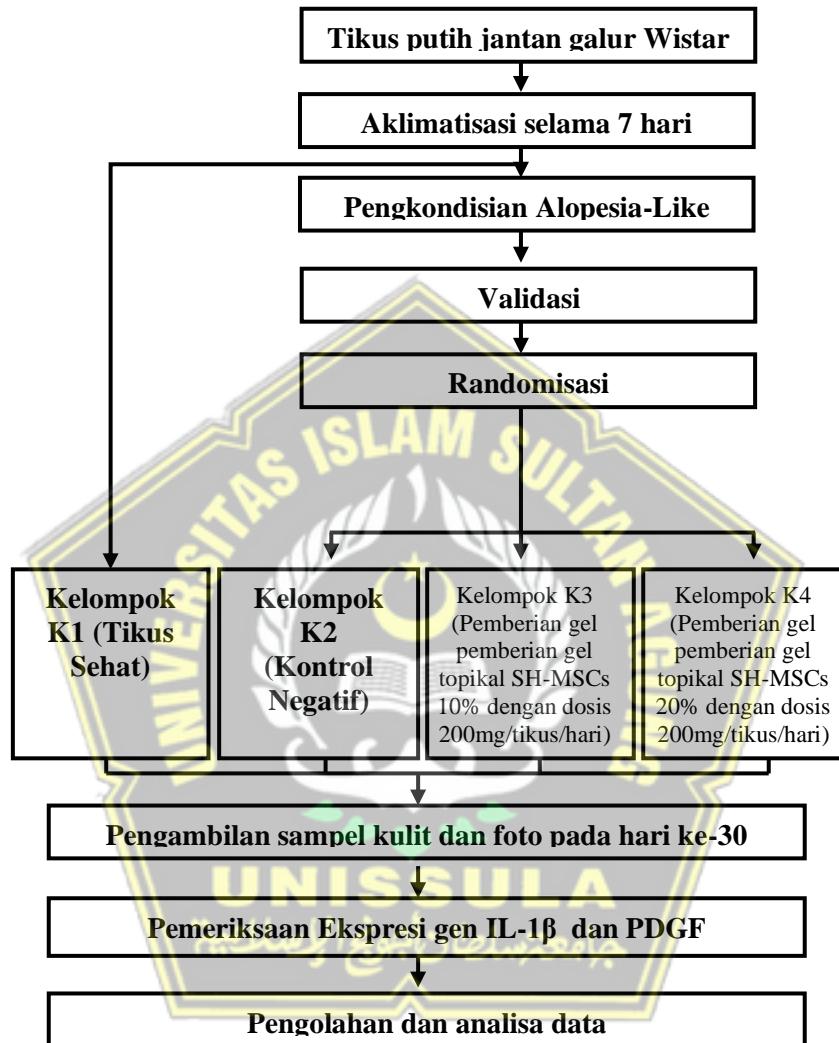
#### 4.8 Preliminary Study



Gambar 4.3 Bagan Alur *Preliminary Study*



#### 4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.4 Bagan Alur Penelitian

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Penelitian

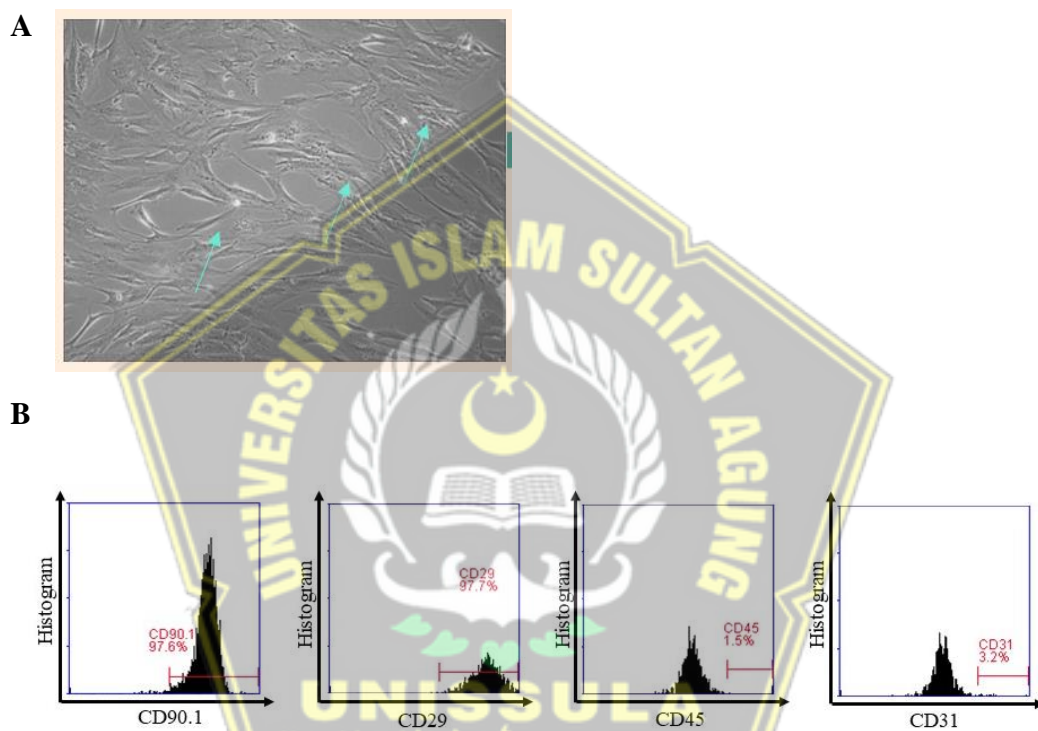
Laboratorium *Research Stem Cell and Cancer* (SCCR) dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dijadikan lokasi kajian eksperimental ini pada bulan Agustus hingga Oktober 2023. Studi ini menggunakan tikus *Wistar* jantan, berumur sekitar 2-3 bulan, dengan berat 200 - 250 gram, yang mengalami *alopecia-like* dengan yang diobati dengan *fluconazole*.

Ada 24 hewan yang terlibat dalam penyelidikan ini, dan tidak ada hewan yang tertinggal. Dua kelompok perlakuan (K3 dan K4), satu kelompok kontrol negatif (K2), dan satu kelompok kontrol normal (K1) menjadi empat kelompok pada studi ini. Enam hewan uji mendapat gel topikal SH-MSCs 10% dengan dosis 200 mg/tikus per hari pada kelompok perlakuan pertama (K3), dan enam hewan uji mendapat gel topikal SH-MSCs 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari pada kelompok kedua (K4). Kelompok kontrol normal (K1) terdiri dari kelompok tikus sehat yang tidak mendapat perlakuan atau intervensi, sedangkan kelompok kontrol negatif (K2) terdiri dari enam hewan uji yang dipapar *fluconazole* tanpa pengobatan apa pun.

##### 5.1.1. Isolasi Secretome *Mesenchymal Stem Cell* Hipoksia (SH-MSCs)

Menggunakan umbilical cord tikus bunting 21 hari, MSCs diisolasi di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Setelah diisolasi, temuan tersebut

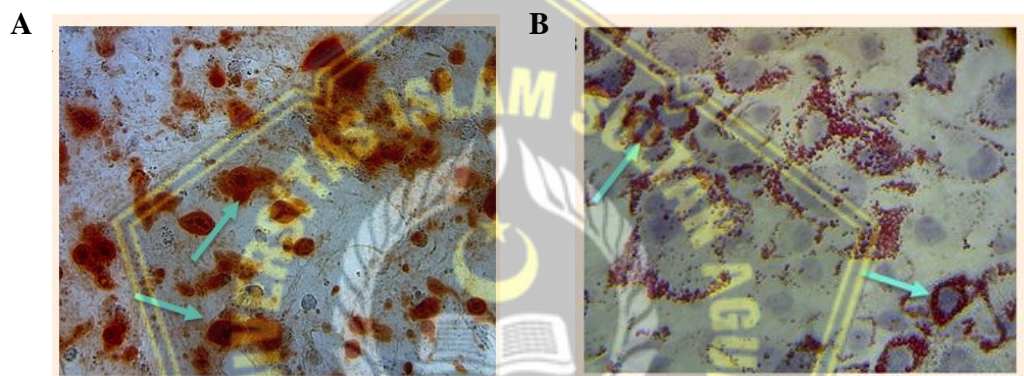
dibudidayakan menggunakan media tertentu dalam flask kultur. Setelah fase kelima, hasil kultur MSCs menampilkan gambaran mikroskopis sel-sel yang menempel pada dasar flask yang memiliki bentuk *spindle-like cell* pada pengamatan mikroskopis (Gambar 5.1).



**Gambar 5.1.** (A) Isolasi MSC dengan konfluen 80% didapatkan gambaran sel berbentuk spindle-like pada pembesaran lensa 100x. (B) Hasil Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31.

Kemampuan MSCs untuk mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus kemudian ditunjukkan dengan analisis *flow cytometry*, yang memverifikasi marker sel MSCs. Studi ini mengklaim, MSCs dapat mengekspresikan CD90 (97,6%), CD29 (97,7%), dan CD45 (1,5%) dan CD31 (3,2%) dalam jumlah kecil (Gambar 5.1).

Kapasitas MSCs untuk berkembang menjadi sel matur yang berbeda juga diperiksa dalam studi ini. Untuk memungkinkan MSCs berkembang menjadi osteosit dan adiposit, diperlukan media khusus. Dengan menerapkan teknik pewarnaan *Alizarin red* dan *oil red o dye* pada kultur osteogenik dan adipogenik, studi ini menunjukkan bahwa MSCs dapat berdiferensiasi menjadi osteosit dan adipositas, seperti yang ditunjukkan oleh endapan kalsium dan lemak dalam bentuk tampilan merah (Gambar 5.2 (A dan B)).



**Gambar 5.2.** (A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) Adiposit setelah pemberian pewarna *alizarin red* dan *oil red o* pada perbesaran lensa 100x

Kemudian, dengan menggunakan ruang hipoksia, sel MSCs dikultur dalam kondisi hipoksia selama 24 jam pada konsentrasi O<sub>2</sub> 5%. Media kultur MSCs yang mengandung sekretom kemudian dikumpulkan, dan metode *tangential flow filtration* (TFF) diterapkan guna menyaring media sesuai *molecular wight cut-off* tertentu guna mendapatkan molekul yang mengandung *transforming growth factor-β* (TGF-β) dan *interleukin-10* (IL-10) yang berukuran 10–50 kDa. MSCs dapat melepaskan IL-10, molekul anti-inflamasi monomer dengan berat molekul sekitar 18 kDa, ketika lingkungan dalam keadaan hipoksia. IL-10 terutama terlibat

dalam proses immunosupresif. Kolagen tipe I diinduksi oleh TGF- $\beta$ , molekul *growth factor* dimerik dengan berat 25 kDa.<sup>38,41</sup> Studi ini mengklaim bahwa analisis kandungan secretome didapatkan kandungan PDGF sebesar  $1093.51 \pm 53.85$  pg/mL dan kandungan IL-10 sebesar  $675.31 \pm 41.35$  pg/mL.

Studi ini juga menerapkan validasi hewan model *alopecia-like* yang dipapar pemberian *fluconazole*. Persentase kebotakan pada tikus sehat adalah  $51,11 \pm 10,27$  % Sedangkan kebotakan pada tikus alopecia adalah  $68,26 \pm 7,96$  %.



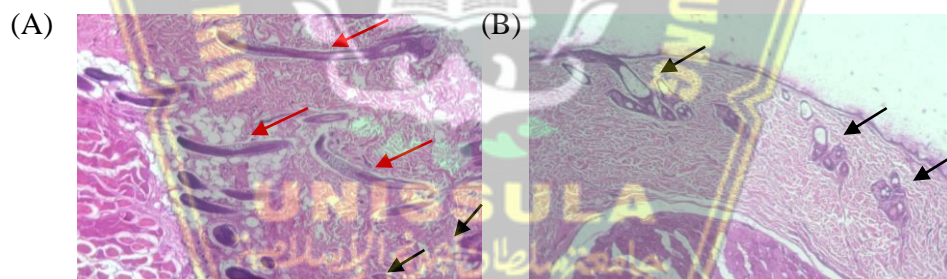
**Gambar 5.3** Validasi makroskopis (A) Tikus sehat hari-14, (B) Tikus yang diberikan paparan *fluconazole* hari-14

Kondisi patogenesis *alopecia-like* terkait pemberian *fluconazole*.

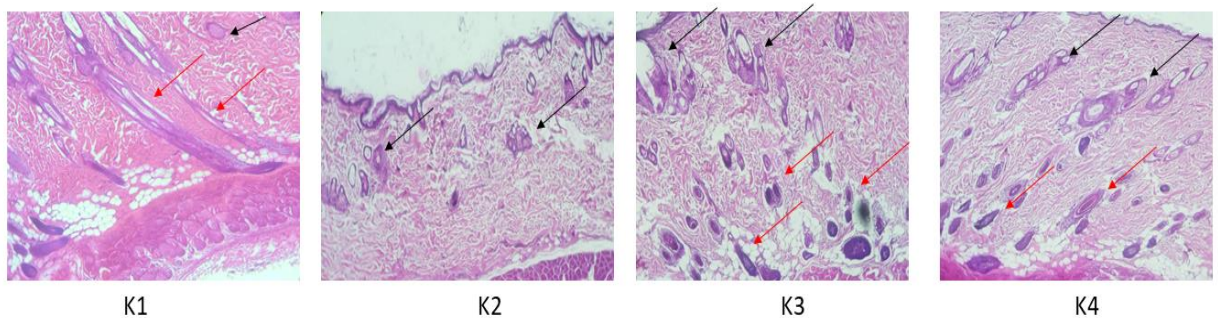
Peningkatan pembentukan ROS akibat paparan *fluconazole* akan memfosforilasi IKK. Ketika IKK terfosforilasi, ia akan bergabung dengan subunit p50 dan p65 untuk membuat kompleks.<sup>56</sup> Degradasi IKK akan terjadi akibat subunit ini karena fungsi ubiquitin. agar subunit p50/p65 memasuki nukleus dan memulai produksi sitokin yang menyebabkan peradangan. Selain itu, fosforilasi STAT3 dan menyebabkan translokasi ke nukleus untuk memulai transkripsi SOSC3 keduanya dipicu oleh pemaparan MSCs pada gel. MAPK akan dipicu oleh SOSC3,

meningkatkan aktivasi NF- $\kappa$ B.<sup>57,61</sup> Agar produksi sitokin inflamasi seperti IL-1 $\beta$  dapat diaktifkan, NF- $\kappa$ B pada akhirnya harus bertranslokasi ke nukleus. Aktivasi sitokin ini akan berdampak pada proses pertumbuhan rambut.

Terhambatnya pertumbuhan rambut secara makroskopis juga didukung dengan data mikroskopis folikel rambut setelah pengecatan HE. Hasil analisis menunjukkan bahwa folikel pada tikus alopesia didominasi pada fase anagen pada kelompok K2, K3 dan K4 dibandingkan dengan kelompok sehat (K1). Pada gambar dibawah ini tampak perbedaan telogen dan anagen pada hewan kelompok sehat dan *alopecia-like* pada hari ke-14. Pada hewan kelompok sehat didapatkan telogen sebanyak 5 dan anagen sebanyak 12, sedangkan pada kelompok *alopecia-like* didapatkan telogen sebanyak 8 dan anagen sebanyak 0. Gambar di bawah menampilkan hasil pewarnaan sampel kulit pada kelompok perlakuan *fluconazole* dan sehat.



**Gambar 5.4** Morfologi follicle kulit hewan model sehat (A) dan Alopecia-like (B) hari ke-14. Panah hitam adalah telogen follicel dan panah merah adalah anagen follicle.



**Gambar 5.5** Gambaran histologi follicle kulit hewan model hari ke-19. Panah hitam adalah telogen follicel dan panah merah adalah anagen follicle.

Perbandingan anagen dan telogen pada hari ke-19 tampak pada tabel di bawah ini. Jumlah folikel yang tampak pada kelompok K3 dan K4 lebih banyak jika dibandingkan dengan K2 dan K1. Hal ini menunjukkan ada peningkatan follicle rambut hewan coba pada hari ke-19 dengan karena pemberian SH-MSCs terhadap Peningkatan maksimal didapatkan pada pemberian dosis MSCs 200uL.

**Tabel 5.1** Perbandingan Fase Anagen dan Telogen Pada Hari ke-19

No	Kelompok	Anagen	Telogen	Total
1	K1 (sehat)	55 (64.71%)	30 (35.29%)	85
2	K2 (Kontrol)	40 (81.63%)	9 (18.34%)	49
3	K3 (Perlakuan Model 1)	109 (54.21%)	49 (45.79%)	107
4	K4 (Perlakuan Model 2)	91 (59.87%)	61 (40.13%)	152

### 5.1.2. Efek pemberian gel SH-MSCs terhadap ekspresi mRNA PDGF

Paparan *fluconazole* ialah salah satu proses patogenik utama yang menyebabkan peradangan, yang ditandai dengan reaksi pertahanan jaringan pada sistem pembuluh darah sebagai respons terhadap rangsangan berbagai elemen yang merusak pertumbuhan rambut. Paparan *fluconazole* telah terbukti menyebabkan pelepasan sitokin inflamasi, seperti PDGF, yang terkait dengan kulit *alopecia-like*. Ketika sel imun yang berbeda diaktifkan oleh PDGF, lingkungan proinflamasi tercipta. Hal ini mempengaruhi pertumbuhan rambut oleh trombosit, yang pada gilirannya mendorong proliferasi sel-sel rambut<sup>50,51</sup> Selain PDGF, MSCs hipoksia menunjukkan peningkatan ekspresi molekul terlarut seperti faktor pertumbuhan, kemokin, dan sitokin dibandingkan dengan keadaan normal. Sitokin dan mediator berikut dikenal sebagai *mesenchymal stem cells* (H-MSCs): IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-



SCF, TNF, IGF -1, dan HGF.<sup>38,41</sup> Sesuai temuan studi, gel SH-MSCs secara signifikan dan bergantung pada dosis meningkatkan ekspresi gen PDGF pada jaringan kulit model tikus *alopecia-like* (Gambar 5.6).

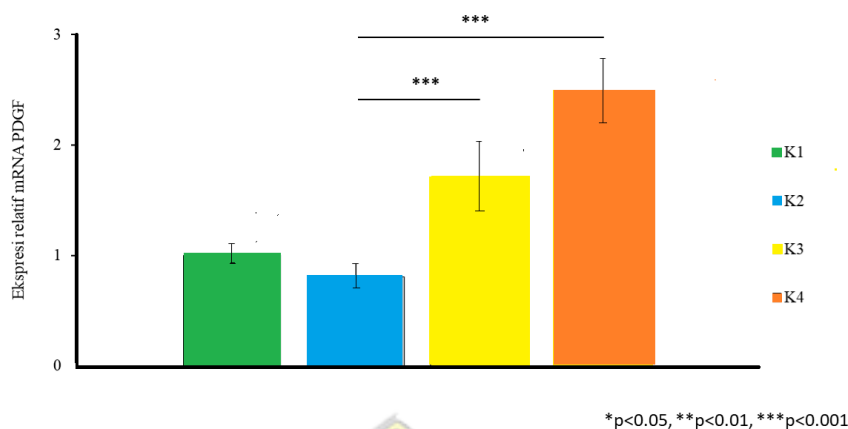
**Tabel 5.2** Data Hasil Penelitian Ekspresi mRNA PDGF

Variabel	Kelompok			p Value
	K2 (Kontrol)	K3	K4	
Ekspresi mRNA PDGF	0.806 ± 0.12	1.71 ± 0.31	2.47 ± 0.3	
<i>Saphiro wilk</i>	0.824	0.245	0.12	
<i>Levene test</i>				< 0.200
<i>One way Anova</i>				0.000*

\*) One Way Anova

Berdasarkan data diatas, K3 (1.71 ± 0.31) dan K4 (2.47 ± 0.3) secara signifikan meningkatkan ekspresi mRNA PDGF. K3 menstimulasi ekspresi PDGF sekitar 0,9 *relative quantification* lebih tinggi dibandingkan K2 dan K4 menstimulasi ekspresi PDGF sekitar 1,6 *relative quantification* lebih tinggi dibandingkan K2 (0.806 ± 0.12). K4 menunjukkan stimulasi ekspresi PDGF yang paling optimal dan menandakan terjadinya stimulasi PDGF yang terkontrol.

Uji normalitas dan homogenitas Shapiro-Wilk dilakukan pada data deskriptif ekspresi PDGF masing-masing kelompok. Uji Levene dimanfaatkan guna menguji homogenitas. Pada setiap kelompok, hasil uji homogenitas dan normalitas menghasilkan nilai signifikansi  $p > 0,05$ . Temuan ini menunjukkan bahwa data berdistribusi normal, sehingga memungkinkan dilanjutkannya uji LSD Post-hoc dan pelaksanaan uji parametrik ANOVA satu arah. Uji ANOVA satu arah menghasilkan perbedaan  $p < 0,05$ .



**Gambar 5.6.** Diagram Batang ekspresi PDGF pada semua kelompok penelitian (\* $p < 0,05$  = signifikan)

Gambar 5.3 dan tabel 5.2 menunjukkan temuan grafis dari tes LSD *post-hoc*. Ada perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok K3 dan K4 dan K2 dalam studi ini.

**Tabel 5.3.** Uji Post-hoc LSD ekspresi PDGF Antar Kelompok Penelitian (IK=95%)

Kelompok	Kelompok	Mean Difference	Std. Error	Sig
K2	K3	-0.907	1.515	0.000*
	K4	-1.67	1.515	0.000*
K3	K2	0.907	1.515	0.000*
	K4	-0.766	1.515	0.000*
K4	K2	1.67	1.515	0.000*
	K3	0.766	1.515	0.000*

\*: Uji *Post Hoc* dengan *significant p* < 0,05

### 5.1.3. Efek pemberian gel SH-MSCs terhadap ekspresi mRNA IL-1 $\beta$

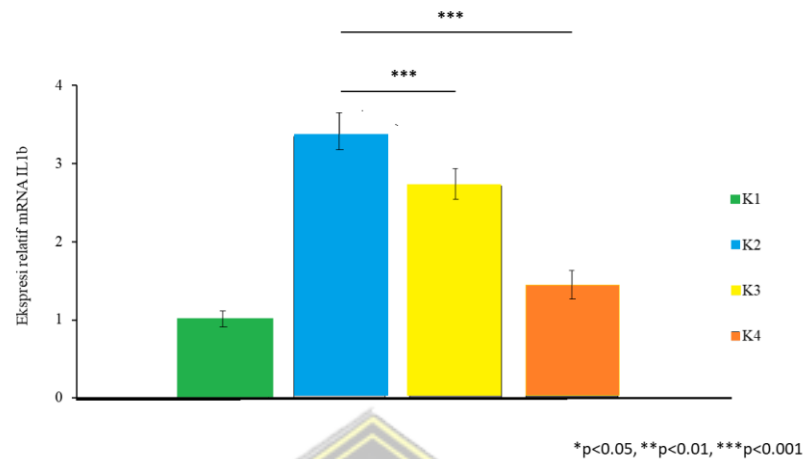
Stimulasi proses inflamasi di lingkungan mikro yang disebabkan oleh paparan *fluconazole* intensitas tinggi mempengaruhi ekspresi sejumlah sitokin proinflamasi. Banyak jalur sinyal intraseluler, seperti jalur *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), mengendalikan peningkatan sitokin pro-inflamasi. Kompleks protein faktor transkripsi yang disebut NF- $\kappa$ B bertugas mengaktifkan sejumlah gen yang menghasilkan produksi sitokin proinflamasi, termasuk IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , dan IFN-

$\gamma$ 27. IL-1 $\beta$  ialah salah satu protein yang membentuk keluarga faktor transkripsi NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B1). Sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  diduga mengaktifkan HFSC untuk memperbaharui follicle rambut yang rusak dan juga mempertahankan morfologi rambut sehingga memungkinkan juga untuk mempertahankan regenerasi rambut. Temuan studi ini menunjukkan bahwa pemberian gel SH-MSCs secara topikal mempengaruhi tren penurunan ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada jaringan kulit tikus model *alopecia-like* (Gambar 5.7).

**Tabel 5.4** Data Hasil Penelitian Ekspresi mRNA IL-1 $\beta$

Variabel	Kelompok			p Value
	K2 (Kontrol)	K3	K4	
Ekspresi mRNA IL-1 $\beta$	3.35 $\pm$ 0.29	2.71 $\pm$ 0.23	1.41 $\pm$ 0.20	
<i>Saphiro wilk</i>	0.44	0.595	0.095	
<i>Levene test</i>				< 0.001
<i>Kurkal Wallis</i>				< 0.001

K3 (2,71  $\pm$  0,23) dan K4 (1,41  $\pm$  0,20) sangat menurunkan signifikansi mensupresi mRNA IL-1 $\beta$ , sesuai data di atas. Sekitar 0,64 *relatif quantification* lebih rendah dari K2, K3 dan 1,94 *relatif quantification* lebih rendah dari K2 (3,35 + 0,29) ialah koefisien penekanan untuk ekspresi IL-1 $\beta$ . K4 menunjukkan stimulasi IL-1 $\beta$  terkontrol dan penghambatan ekspresi IL-1 $\beta$  paling optimal.



**Gambar 5.7.** Diagram Batang ekspresi IL-1 $\beta$  pada semua kelompok penelitian (\* $p < 0,05$  = signifikan)

Dengan menerapkan uji normalitas Shapiro-Wilk dan uji homogenitas Levene, ekspresi IL-1 $\beta$  pada masing-masing kelompok diperiksa dalam data deskriptif. Sesuai temuan uji homogenitas dan normalitas, seluruh kelompok mempunyai nilai signifikansi  $p > 0,05$ . Temuan ini menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga memungkinkan penggunaan uji analitik Kruskal Wallis dan tercapainya  $p < 0,05$ .

**Tabel 5.5. Uji Mann Whitney ekspresi IL-1 $\beta$  antar kelompok penelitian (IK=95)**

Kelompok	Kelompok	Mean Difference	Std. Error	Sig
K2	K3	1.003	0.1092	0.000*
	K4	1.927	0.1092	0.000*
K3	K2	-1.003	0.1092	0.000*
	K4	0.924	0.1092	0.000*
K4	K2	-1.927	0.1092	0.000*
	K3	-0.924	0.1092	0.000*

\*: Uji Mann Whitney dengan *significant*  $p < 0,05$

## 5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Salah satu agen penyebab *alopecia - like* adalah *fluconazole*. Obat *fluconazole* dan triazole menunjukkan interaksi dengan sistem P-450.<sup>2</sup> Katalis pengoksidasi dalam metabolisme asam lemak, xenobiotik, obat-obatan, racun, dan karsinogen ialah P-450, yakni suatu enzim tipe hemeprotein. *Fluconazole* dosis tinggi menyebabkan peningkatan kadar retinoid endogen dan dapat membuat kerontokan rambut yang reversible.<sup>3</sup> Sitokin interleukin 1  $\beta$  (IL- 1 $\beta$ ) merupakan penginduksi yang sangat kuat terhadap rambut rontok dan penghambat pertumbuhan rambut manusia yang signifikan.<sup>2</sup> Kadar *pean Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) yang menurun dapat menyebabkan *alopecia – like*.<sup>1</sup>

Hal ini menyiratkan bahwa penghambatan jalur sinyal NF- $\kappa$ B diperkirakan akan mengurangi reaksi inflamasi yang disebabkan oleh paparan *fluconazole*. Maksud studi ini ialah guna mengungkap bagaimana injeksi gel SH-MSCs mempengaruhi ekspresi PDGF dan IL-1 $\beta$  mRNA pada tikus model *alopecia-like*. Sebab tikus Wistar jantan memiliki kulit yang mirip dengan manusia, model photoaging kulit mereka dimanfaatkan dalam menganalisis sifat anti-inflamasi gel SH-MSCs. Paparan *fluconazole* selama dua minggu dimanfaatkan guna menginduksi tikus.

Pada studi ini, ekspresi mRNA sitokin pro-inflamasi PDGF diperiksa. PDGF terlibat dalam timbulnya peradangan sistemik. Hasilnya menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam ekspresi mRNA PDGF di semua kelompok perlakuan berbeda dengan kontrol (K2), dengan peningkatan tertinggi terjadi pada gel SH-MSCs pada dosis 200  $\mu$ L. Hal ini diduga terjadi karena mRNA PDGF

menginduksi aktivitas enzim HF, yang pada gilirannya mengaktifkan SHH dan LEF-1 sebagai sitokin, sehingga mendorong pertumbuhan rambut.<sup>56</sup>

Studi terdahulu mengklaim, PDGF dan IL-10 dapat mengurangi peradangan dengan mengaktifkan sejumlah protein intraseluler, termasuk *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3). *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT-3) akan dipicu oleh pengikatan IL-10 pada reseptor.<sup>57</sup> Urutan mRNA SOCS3 akan diaktifkan dengan masuknya protein STAT3 ke dalam nukleus. Selanjutnya, ekspresi intraseluler dari protein SOCS3 menghambat banyak jalur sinyal proinflamasi, termasuk NF- $\kappa$ B. Jalur NF- $\kappa$ B akan ditekan sehingga akan meningkatkan pelepasan beberapa sitokin, termasuk PDGF.<sup>58</sup>

Studi ini menunjukkan bahwa pemberian gel SH-MSCs pada semua perlakuan mampu mengurangi ekspresi mRNA IL-1 $\beta$  dibandingkan dengan kontrol (K2) pada tikus model *alopecia-like*, mendukung penekanan jalur NF- $\kappa$ B. Dosis gel SH-MSCs 200  $\mu$ L menghasilkan pengurangan ekspresi mRNA IL-1 $\beta$  yang paling optimal. Tampaknya pemberian SH-MSCs mampu mengendalikan proses inflamasi pada tikus model *alopecia-like* sesuai penurunan ekspresi mRNA IL-1 $\beta$  pada kelompok perlakuan. Berbeda dengan pengobatan berbasis gel, kelompok perlakuan K3 dan K4 mampu menurunkan ekspresi gen IL-1 $\beta$  secara signifikan.<sup>57, 61</sup>

Dua protein yang termasuk dalam keluarga NF- $\kappa$ B ialah protein p50 (NF- $\kappa$ B1) dan IL-1 $\beta$ . Jenis protein NF- $\kappa$ B yang paling umum yang dapat membentuk heterodimer ialah NF- $\kappa$ B1.<sup>70</sup> Studi terdahulu menunjukkan bahwa penghambat

protein *inhibitory kappa B* (I $\kappa$ B) mengikat kompleks heterodimer p50 dan p65 di sitoplasma ketika pertama kali berada dalam fase tidak aktif.<sup>70</sup> Kompleks I $\kappa$ B kinase (IKK) diaktifkan oleh berbagai rangsangan, termasuk sitokin pro-inflamasi dan obat-obatan yang dihasilkan selama proses *alopecia like*. Hal ini menyebabkan fosforilasi protein I $\kappa$ B, yang mempengaruhi poliubiquitinisasi dan proteolisis molekul.<sup>71</sup> Setelah dilepaskan, kompleks protein p50 dan p65 berpindah ke dalam nukleus, di mana ia berikatan dengan rangkaian DNA tertentu di wilayah promotor gen target untuk memfasilitasi transkripsi. Subunit p50 sangat penting untuk melampirkan NF- $\kappa$ B ke urutan DNA yang berbeda, sedangkan subunit p65 mengontrol aktivitas transkripsi kompleks DNA.<sup>70,71</sup>

Secara masif, temuan studi ini menunjukkan bahwa gel SH-MSCs memiliki efek anti-inflamasi pada model hewan *alopecia-like* dengan meningkatkan regulasi ekspresi PDGF mRNA dan menurunkan regulasi IL-1 $\beta$  mRNA. Ini menyiratkan bahwa SH-MSCs dapat dibuat sebagai pengobatan yang ditargetkan untuk menghambat proses inflamasi, khususnya pada penyakit *alopecia-like*.

### 5.3. Kelemahan Penelitian

Studi ini mengandung kekurangan yakni tidak menyelidiki bagaimana pemberian SH-MSCs mempengaruhi jumlah, ekspresi protein intraseluler, atau ekspresi mRNA dari sitokin anti-inflamasi seperti p38, yang kemungkinan besar berperan dalam mengurangi proses inflamasi. Selain itu, protein intraseluler SOSC3 dan STAT3, yang merupakan pemain kunci dalam menghambat jalur NF- $\kappa$ B, tidak dikaji pada studi ini.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Studi ini menghasilkan kesimpulan dari temuan, yakni:

1. Pada model tikus *alopecia-like* yang disebabkan oleh paparan fluconazole, aplikasi topikal gel SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari berdampak secara bermakna dalam meningkatkan ekspresi mRNA PDGF di kulit.
2. Ekspresi IL-1 $\beta$  mRNA pada kulit model tikus *alopecia-like* yang disebabkan oleh paparan *fluconazole* berkurang secara drastis dengan aplikasi topikal gel SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari.

#### 6.2 Saran

Sejumlah rekomendasi pada studi ini ialah:

1. Setelah pemberian gel SH-MSCs pada tikus model *alopecia-like*, kadar, ekspresi protein intraseluler, dan ekspresi mRNA p38 harus diukur.
2. Pengukuran ekspresi protein SOSC3 diperlukan setelah pemberian gel SH-MSCs pada tikus model *alopecia-like*.
3. Setelah pemberian gel SH-MSCs ke tikus model *alopecia-like*, ekspresi STAT3 harus diukur.



4. Perlu dilakukan koreksi pada sejumlah titik waktu selama fase inflamasi, proliferasi, dan remodeling setelah gel SH-MSCs diaplikasikan pada model tikus dengan gejala *alopecia-like*.



## DAFTAR PUSTAKA

1. ME Llau et al. Drug-induced Alopecia: Review of the literature. Therapie. Pubmed. 1995
2. Kim JE, Lee YJ, Lee KJ, Park SH, Kang H. Ex Vivo Treatment with Allogenic Mesenchymal Stem Cells of a Healthy Donor on Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Severe *Alopecia* Areata: Targeting Dysregulated T Cells and the Acquisition of Immunotolerance. Int J Mol Sci. 2022 Nov 1;23(21).
3. Deng W, Zhang Y, Wang W, Song A, Mukama O, Huang J, 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 Dec 1;12(1).
4. AlSogair S. Stem cell therapy and hair loss: Present evidence and future perspectives. Journal of Dermatology and Dermatologic Surgery. 2019;23(2):61.
5. Rambwawasvika H. *Alopecia* types, current and future treatment. Journal of Dermatology & Cosmetology. 2021;5(4):93–9.
6. Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media Induces Hair Regeneration in *Alopecia* Areata: A Case Study
7. Kamp H, Geilen CC, Sommer C, Blume-Peytavi U, Blume-Peytavi U. Regulation of PDGF and PDGF receptor in cultured dermal papilla cells and follicular keratinocytes of the human hair follicle. Vol. 12, Exp Dermatol. # Blackwell Munksgaard; 2003.
8. Kavianpour M, Saleh M, Verdi J. The role of mesenchymal stromal cells in immune modulation of COVID-19: Focus on cytokine storm. Vol. 11, Stem Cell Research and Therapy. BioMed Central Ltd; 2020
9. Ratushnyy A, Ezdakova M, Buravkova L. Secretome of senescent adipose-derived mesenchymal stem cells negatively regulates angiogenesis. Int J Mol Sci. 2020 Mar 1;21(5).

10. Donovan J, Shiwen X, Norman J, Abraham D. Platelet-derived growth factor alpha and beta receptors have overlapping functional activities towards fibroblasts
11. Tomita Y, Akiyama M, Shimizu H. PDGF isoforms induce and maintain anagen phase of murine hair follicles. *J Dermatol Sci.* 2006 Aug;43(2):105–15.
12. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell.* 2014 Dec 22;31(6):722–33.
13. Ahn SY, Pi LQ, Hwang ST, Lee WS. Effect of IGF-I on hair growth is related to the anti-apoptotic effect of IGF-I and up-regulation of PDGF-A and PDGF-B. *Ann Dermatol.* 2012 Feb;24(1):26–31.
14. Ratushnyy A, Et al. Secretome of Senescent Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Negatively Regulates Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21:2-16
15. Donovan et al. Platelet-derived growth factor alpha and beta receptors have overlapping functional activities towards fibroblasts. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2013, 6:10
16. Balasubramanian S, et al, Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation. *J of Cosmetics, Dermatological Sciences and App. Skin Ageing (Special Issue)*:99-117
17. Kim YJ, et al, Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin *Biochem Biophys Rep.* 2018 Dec; 16: 96–102.
18. Siah TW, Guo H, Chu T, Santos L, Nakamura H, Leung G, et al. Growth factor concentrations in platelet-rich plasma for androgenetic alopecia : An intra-subject, randomized, blinded, placebo-controlled, pilot study. *Exp Dermatol.* 2020 Mar 1;29(3):334–40.

19. Aljuffali IA, Pan TL, Sung CT, Chang SH, Fang JY. Anti-PDGF receptor  $\beta$  antibody-conjugated squarticles loaded with minoxidil for *alopecia* treatment by targeting hair follicles and dermal papilla cells. *Nanomedicine*. 2015;11(6):1321–30.
20. Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. Vol. 7, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2022.
21. Hoffmann ROL, Eich W, Enzel EW, Appl RH. Interleukin-1 $\alpha$ -Induced Inhibition of Hair Growth In Vitro Is Mediated by Cyclic AMP. 1997.
22. Tomaszewska K, Kozłowska M, Kaszuba A, Lesiak A, Narbutt J, Zalewska-Janowska A. Increased Serum Levels of IFN- $\gamma$ , IL-1  $\beta$ , and IL-6 in Patients with *Alopecia* Areata and Nonsegmental Vitiligo. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
23. Redondo-Castro E, Cunningham C, Miller J, Martuscelli L, Aoulad-Ali S, Rothwell NJ, et al. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Apr 17;8(1).
24. Chen YC, Fu YS, Tsai SW, Wu PK, Chen CM, Chen WM, et al. IL-1 $\beta$  in the Secretomes of MSCs Seeded on Human Decellularized Allogeneic Bone Promotes Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 1;23(23).
25. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
26. Caseiro AR, Pedrosa SS, Ivanova G, Branquinho MV, Almeida A, Faria F, et al. Mesenchymal Stem/ Stromal Cells metabolomic and bioactive factors profiles: A comparative analysis on the umbilical cord and dental pulp derived Stem/ Stromal Cells secretome. *PLoS One*. 2019 Nov 1;14(11).
27. Rana N, Suliman S, Al-Sharabi N, Mustafa K. Extracellular Vesicles Derived from Primed Mesenchymal Stromal Cells Loaded on Biphasic

- Calcium Phosphate Biomaterial Exhibit Enhanced Macrophage Polarization. *Cells*. 2022 Feb 1;11(3).
28. Quiñones-Vico MI, Sanabria-de la Torre R, Sánchez-Díaz M, Sierra-Sánchez Á, Montero-Vílchez T, Fernández-González A, et al. The Role of Exosomes Derived From Mesenchymal Stromal Cells in Dermatology. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
  29. Sari DS, Maduratna E, Bumi C, Sudiana IK, Rantam FA. Role of secretome mesenchymal stem cells as immunomodulator in periodontal diseases. *Journal of Dentomaxillofacial Science*. 2021 Dec 1;6(3):139.
  30. Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focus Tumor Microenviron Stem cells Metastasis* 2011. doi:10.5772/21325.
  31. Foo JB, Looi QH, Chong PP, Hassan NH, Yeo GEC, Ng CY, et al. Comparing the Therapeutic Potential of Stem Cells and their Secretory Products in Regenerative Medicine. Vol. 2021, *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2021.
  32. Anderi R, Makdissy N, Azar A, Rizk F, Hamade A. Cellular therapy with human autologous adipose-derived adult cells of stromal vascular fraction for *alopecia areata*. *Stem Cell Res Ther*. 2018 May 15;9(1).
  33. Thompson GR, Krois CR, Affolter VK, Everett AD, Katarina Varjonen E, Sharon VR, et al. Examination of *fluconazole*-induced *alopecia* in an animal model and human cohort. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Feb 1;63(2).
  34. Ito T, Kageyama R, Nakazawa S, Honda T. Understanding the significance of cytokines and chemokines in the pathogenesis of *alopecia areata*. Vol. 29, *Experimental Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. 726–32.
  35. Naguib YW, Cui Z. *Nanomedicine : The Promise*. 2014; : 135–156.
  36. Cole JP, Cole MA, Insalaco C, Cervelli V, Gentile P. *Alopecia* and platelet-derived therapies. *Stem Cell Investig*. 2017 Nov 1;4(11).

37. Hansen T, Little AJ, Miller JJ, Ioffreda MD. A Case of Inflammatory Nonscarring *Alopecia* Associated With the Tyrosine Kinase Inhibitor Nilotinib [Internet]. Vol. 149, JAMA Dermatol. 2013.
38. Anindhita Ayu Ardhaninggar A. Penatalaksanaan *Alopecia* Areata (Treatment of *Alopecia* Areata).
39. AlSogair S. Stem cell therapy and hair loss: Present evidence and future perspectives. Journal of Dermatology and Dermatologic Surgery. 2019;23(2):61.
40. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014; **12**: 1–14.
41. Anderi R, Makdissy N, Rizk F, Hamade A. WITHDRAWN: Hair quality improvement in *alopecia* patients following adipose-derived stem cell treatment. JPRAS Open. 2017 Feb;
42. Salhab O, Khayat L, Alaaeddine N. Stem cell secretome as a mechanism for restoring hair loss due to stress, particularly *alopecia* areata: narrative review. Vol. 29, Journal of Biomedical Science. BioMed Central Ltd; 2022.
43. Taghiabadi E, Nilforoushzadeh MA, Aghdami N. Maintaining Hair Inductivity in Human Dermal Papilla Cells: A Review of Effective Methods. Vol. 33, Skin Pharmacology and Physiology. S. Karger AG; 2020. p. 280–92.
44. Chi W, Wu E, Morgan BA. Dermal papilla cell number specifies hair size, shape and cycling and its reduction causes follicular decline. Development (Cambridge). 2013 Apr;140(8):1676–83.
45. Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2001; **280**: 1196–1202.

46. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; **38**: 164.
47. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C *et al.* Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells* 2019; **12**: 218–226.
48. Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D Syst* 2018.
49. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 2019; **10**: 1–10.
50. Sargent A, Miller RH. MSCs Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Reports* 2016; **2**: 168–173.
51. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19092783.
52. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M *et al.* Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; **7**: 305–310.
53. Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential *World J Stem Cells* 2017; **8**: 158
54. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 552.
55. Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 $\beta$  maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–15

56. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, et al. NF- $\kappa$ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Investig* 2012;122:2601–12.80
57. Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF- $\kappa$ B in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: Epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxidants Redox Signal* 2008; **10**: 799–811.
58. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; **38**: 164.
59. Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules* 2020; **10**: 1–15.
60. Omoigui S. The Interleukin-6 inflammation pathway from cholesterol to aging - Role of statins, bisphosphonates and plant polyphenols in aging and age-related diseases. *Immun Ageing* 2007; **4**: 1–22.
61. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front Immunol* 2018; **9**: 1–17.
62. Federer W. *Statistics and society: data collection and interpretation*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1991.
63. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies?. *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303-306.
64. Sunarto, *et al.*, 2020. The Role of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing *Indones. J. Cancer Chemoprevent.*, **11**(3), 134-143
65. Fredianto et al. Secretome of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells enhance the expression of HIF-1 $\alpha$  and bFGF in a rotator cuff tear model. *Med Glas (Zenica)* 2023; 20(2):242-248



66. Restimulia L, Ilyas S, Munir D, Putra A, Madiadipoera T, Farhat F, Sembiring RJ, Ichwan M, Amalina ND, Alif I. The CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells Regulated by MSCs Suppress Plasma Cells in a Mouse Model of Allergic Rhinitis. *Med Arch*. 2021;75(4):256-261.
67. Feng Q, Gao B, Zhao X, Huang H, Yi S, Zou L, Liu X, Xue M, Xu D. Establishment of an animal model of intrauterine adhesions after surgical abortion and curettage in pregnant rats. *Ann Transl Med*. 2020;8(4):56.
68. Hristu R, Stanciu SG, Dumitru A, Paun B, Floroiu I, Costache M, Stanciu GA. Influence of hematoxylin and eosin staining on the quantitative analysis of second harmonic generation imaging of fixed tissue sections. *Biomed Opt Express*. 2021;12(9):5829-5843.
69. Masuadi E, Mohamud M, Almutairi M, Alsunaidi A, Alswayed AK, Aldhafeeri OF. Trends in the Usage of Statistical Software and Their Associated Study Designs in Health Sciences Research: A Bibliometric Analysis. *Cureus*. 2021;13(1):e12639
70. Makino S, Mitsutake N, Nakashima M, Saenko VA, Ohtsuru A, Umezawa K, et al. DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, suppresses growth and type I collagen accumulation in keloid fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2008;51:171–80.
71. Saggini A, Maccauro G, Tripodi D, De Lutiis MA, Conti F, Felaco P *et al*. Allergic inflammation: Role of cytokines with special emphasis on IL-4. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; **24**: 305–311.