

**PENGARUH PEMBERIAN GEL TOPIKAL *SECRETOME*
HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS (SH-MSCs)
TERHADAP EKSPRESI GEN IL-10 DAN TNF- α
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Jantan Galur *Wistar* Model
Alopesia like yang diinduksi *fluconazole*)**

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2



Indah Permata Hati

MBK.22.19.010283

**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-
10 DAN TNF- α (Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Jantan Galur *Wistar*
Model *Alopecia like* yang diinduksi *fluconazole*)**

disusun oleh
Indah Permata Hati
MBK.22.19.010283

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

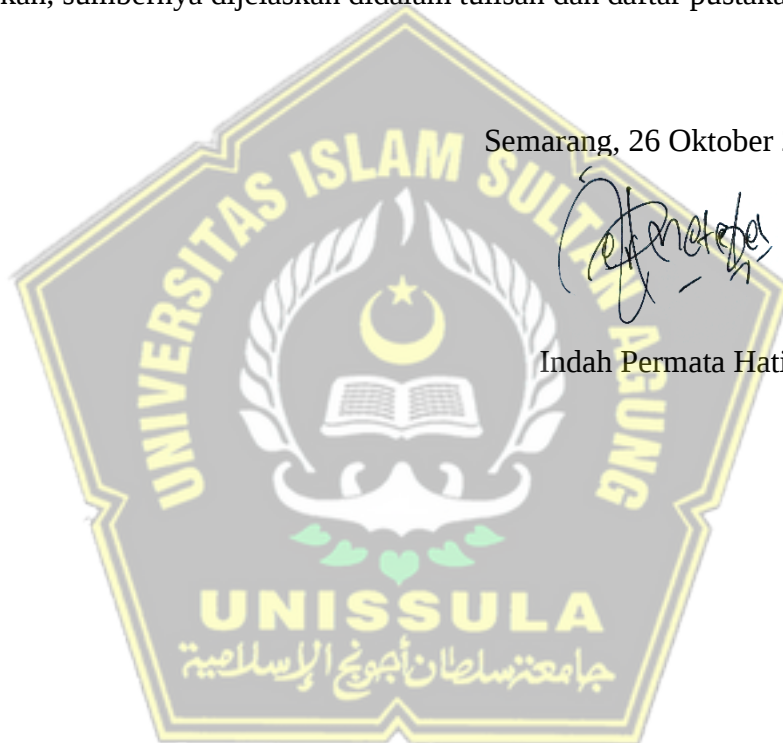
PERNYATAAN

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

Semarang, 26 Oktober 2023



Indah Permata Hati



RIWAYAT HIDUP

Identitas

Nama : dr. Indah Permata Hati
Tempat/Tanggal Lahir : Kuningan, 26 Juni 1988
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

Riwayat Pendidikan

SD N 1 Cilimus : Lulus Tahun 2000
SMP N 1 Cilimus : Lulus Tahun 2003
SMA N 1 Cilimus : Lulus Tahun 2006
S1 Universitas YARSI : Lulus Tahun 2013
S2 Biomedik FK Unissula : 2022 - sekarang

Riwayat Pekerjaan

Tahun 2015 - 2016 : RS Siti Khodijah, Palembang
Tahun 2016 - 2017 : RS YK Madira, Palembang
Tahun 2018 : Klinik Utama Difatra Medika, Palembang Tahun
2018 – 2019 : ZA Wellness Clinic, Palembang
Tahun 2019 – sekarang : IPH Skin Clinic, Palembang

Riwayat Keluarga

Ayah : Cecep Ahmad Arifin
Ibu : Bdn. Rodiawati, SSiT., S.Keb.
Suami : Fitra Anugra, S.H., M.M.
Anak :
1. Naura Shafa Anugra
2. Nayla Aleesya Anugra

KATA PENGANTAR

Puji syukur keadilat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul **Pengaruh Pemberian Gel Topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) Terhadap Ekspresi gen IL-10 dan TNF- α . (Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Jantan Galur Wistar Model Alopecia like yang diinduksi *fluconazole*)**

Pada penyusunan 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, sekaligus sebagai penguji yang banyak memberikan saran dan masukan dalam proses penyelesaian tesis.
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 penyelesaian tesis ini

4. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan selama penyelesaian laporan tesis ini.
5. Prof. Dr. dr. Hj. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E, Subsp.D.K.E, FINSADV, FAADV selaku penguji yang telah memberikan kritik, saran serta bimbingan dalam penyelesaian hasil tesis ini.
6. Dr. dr Chodidjah, M.Kes selaku penguji yang telah memberikan kritik, saran serta bimbingan dalam penyelesaian hasil tesis ini.
7. Pada dosen pengajar dan rekan – rekan staf Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan banyak bantuan dan dorongan dalam penyelesaian tesis ini.
8. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
9. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan hasil 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 studi Magister Ilmu Biomedik serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua, amin

Semarang, 26 Oktober 2023



(Indah Permata Hati)

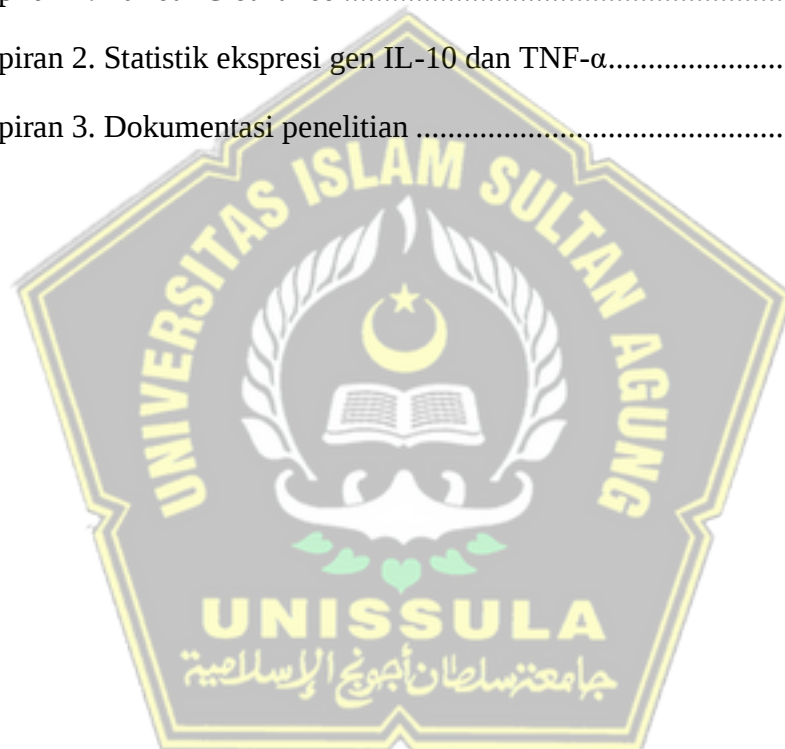
DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	i
PERNYATAAN.....	ii
RIWAYAT HIDUP	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR BAGAN.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian.....	4
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Originalitas Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Interleukin 10 (IL-10).....	9
2.1.1 Pengertian	9
2.1.2 Peran IL-10 pada penyakit alopesia.....	11

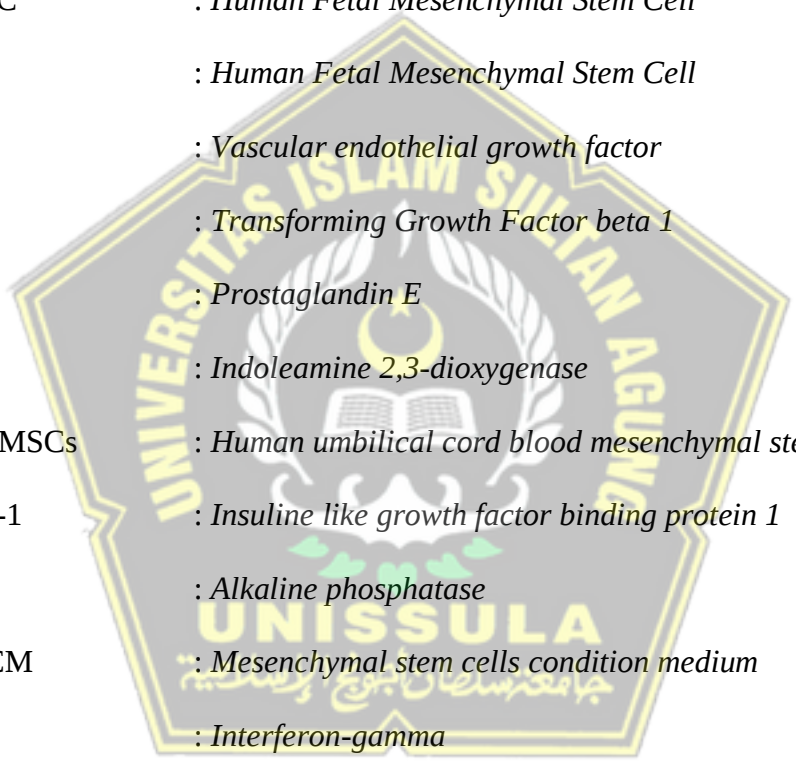
2.2 <i>Tumor Necrosis Factor α</i> (TNF- α).....	13
2.2.1 Pengertian TNF- α	13
2.2.2 Jalur Aktivasi TNF- α	13
2.2.3 Hubungan ekspresi TNF- α dengan alopecia	15
2.3 Rambut	16
2.3.1 Pengertian	16
2.3.2 Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan rambut.....	17
2.3.3 Kerontokan rambut	18
2.4 Sel Punca Mesenkimal (<i>Mesenchymal Stem Cell</i>)	21
2.4.1 Penelitian sel punca mesenkimal pada rambut	24
2.5 <i>Secretome</i> MSC.....	25
2.6 <i>Alopecia Areata</i>	27
2.6.1 Manifestasi klinis <i>Alopecia Areata</i>	28
BAB III Kerangka teori, Kerangka konsep, dan Hipotesis.....	32
3.1 Kerangka teori	32
3.2 Kerangka konsep.....	35
3.3 Hipotesis Penelitian.....	35
BAB IV METODE PENELITIAN	36
4.1 Jenis dan rancangan penelitian	36
4.2 Subyek dan sampel penelitian	37
4.2.1 Subyek penelitian.....	37
4.2.2 Sampel penelitian.....	37
4.2.3 Besar sampel.....	38
4.3 Variabel dan devenisi operasional.....	38
4.3.1 Variabel penelitian.....	38

4.3.2 Definisi operasional	39
4.4 Bahan penelitian	40
4.5 Peralatan penelitian	40
4.6 Prosedur dan alur penelitian	41
4.6.1 <i>Ethical clearence</i>	41
4.6.2 Cara penelitian	41
4.6.3 Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	43
4.6.4 Proses Hipoksia	44
4.6.5 Proses Pembuatan Sediaan Gel Topikal	44
4.6.6 Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	45
4.6.6 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA	47
4.6.7 Pembacaan ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (RTq-PCR)	48
4.7 Teknik pengumpulan dan Analisa data	50
4.8 Jadwal pelaksanaan penelitian	50
4.8.1 Tempat pelaksanaan	50
4.8.2 Waktu penelitian	50
4.8.3 Alur penelitian	51
4.8.4 Jadwal Waktu Penelitian	52
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	53
5.1 Hasil Penelitian	53
5.1.1 Isolasi SH-MSCs dari <i>Umbilical Cord</i>	53
5.1.2 Validasi Makroskopis dan Pewarnanan Histopatologi HE	56
5.1.3 Ekspresi gen IL-10 dan TNF- α pada tikus model <i>alopecia like</i> dengan pemberian SH-MSCs.	58

5.2 Pembahasan	62
BAB VI KESIMPULAN.....	67
6.1 Kesimpulan.....	67
6.2 Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	77
Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	77
Lampiran 2. Statistik ekspresi gen IL-10 dan TNF- α	78
Lampiran 3. Dokumentasi penelitian	83



DAFTAR SINGKATAN



TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
IFN-C	: <i>Interferon</i>
SH-MSCs	: <i>Secretome hypoxia mesenchymal stem cells</i>
ORSCs	: <i>Mesenchymal stem cell conditioned medium</i>
Hf-MSC	: <i>Human Fetal Mesenchymal Stem Cell</i>
PDGF	: <i>Human Fetal Mesenchymal Stem Cell</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
TGF β 1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E</i>
IDO	: <i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
hUCB-MSCs	: <i>Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells</i>
IGFBP-1	: <i>Insuline like growth factor binding protein 1</i>
ALP	: <i>Alkaline phosphatase</i>
MSC-CM	: <i>Mesenchymal stem cells condition medium</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
STAT	: <i>Signal transducer and activator of transcription proteins</i>
JAK1	: <i>Janus kinase 1</i>
Tyk2	: <i>Tyrosin kinase 2</i>
BCR	: <i>The breakpoint cluster region protein</i>
MHC II	: <i>Major histocompatibility complex II</i>
APC	: <i>Activator protein CDH₁</i>
TRADD	: <i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death</i>

domain protein

TRAF2 : *TNF receptor-associated factor 2*

FADD : *FAS-associated death domain protein*

MEKK1 : *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*

ASK1 : *Apoptosis signal-regulating kinase 1*

PBMC : *Peripheral blood mononuclear cell*

DHT : *Dehydrogenase E1 and transketolase*



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur sekresi IL-10.....	10
Gambar 2.2 Jalur transduksi sinyal TNF.....	14
Gambar 2.3 Struktur lapisan rambut.	16
Gambar 2.4 Siklus rambut.....	27
Gambar 2.5 Sub tipe Alopesia Areata.....	30
Gambar 5.1 hasil kultur MSC	54
Gambar 5.2 uji diferensiasi adipogenik, pewarnaan <i>oil red O</i> uji diferensiasi osteogenik menggunakan pewarnaan <i>Alizarin red</i>	54
Gambar 5.3 Uji konfirmasi dengan <i>flow cytometry</i>	55
Gambar 5. 4 Perbandingan pertumbuhan bulu tikus sehat dengan tikus yang diberikan <i>fluconazole</i>	56
Gambar 5.5 Validasi folikel rambut tikus sehat dan <i>alopecia like</i> menggunakan HE. Panah hitam menunjukkan folikel fase telogen, panah merah menunjukkan folikel fase anagen	57
Gambar 5. 6 Grafik ekspresi gen IL-10 tiap kelompok	59
Gambar 5.7 Grafik ekspresi gen TNF- α tiap kelompok.....	60

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5.1 Analisa kandungan sitokin <i>growth factor</i> dan	56
Tabel 5.2 Ekspresi gen IL-10 dan TNF- α	58
Tabel 5.3 Perbandingan ekspresi gen IL-10 antar kelompok.....	61
Tabel 5.4 Perbandingan ekspresi gen TNF- α antar kelompok.....	61



DAFTAR BAGAN

Bagan 3.1 Kerangka Teori	34
Bagan 3.2 Kerangka konsep.....	35
Bagan 4.1 Alur penelitian	51



ABSTRAK

Latar Belakang: Alopesia adalah kelainan dermatologis yang ditandai dengan gangguan pada fase anagen yang lebih pendek dan fase telogen yang lebih panjang dalam siklus rambut. Terapi dengan efek samping iritan dan dermatitis kontak, alergi pada kulit kepala, menyebabkan peningkatan kerontokan rambut. Alternatif terapi menggunakan *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) yang aman dan efektif menjadi pilihan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan TNF- α pada tikus Wistar dengan model alopesia like yang diinduksi *flukonazole*.

Metode: Penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok yaitu 2 kelompok perlakuan dan intervensi dosis gel topikal SH-MSCs dosis 20 μ L dan dosis 40 μ L, 1 kelompok perlakuan yang tidak mendapatkan intervensi (kontrol base gel) dan 1 kelompok tikus sehat. Analisa jaringan kulit dilakukan pada hari ke 22 untuk menilai ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan metode RT-PCR.

Hasil Penelitian: Ekspresi gen IL-10 dengan uji *One way Anova* didapat nilai 0,00 ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan signifikan ekspresi gen IL-10 antar kelompok pada tikus dengan model alopesia like. Hasil data ekspresi gen TNF- α dengan nilai 0,00 ($p < 0,05$) diketahui perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan.

Kesimpulan: Pemberian berbagai dosis gel topikal SH-MSCs meningkatkan ekspresi gen IL-10 dan menurunkan ekspresi gen TNF- α pada tikus Wistar dengan model alopesia like yang diinduksi *fluconazole*, dengan penggunaan gel topikal SH-MSCs dosis 40 μ L merupakan memiliki pengaruh paling palng signifikan dibanding kelompok lainnya.

Kata Kunci : Alopecia like, gel topikal SH-MHSCs, TNF- α , IL-10

ABSTRACT

Background: Alopecia is a dermatological disorder characterized by disturbances in the shorter anagen phase and longer telogen phase in the hair cycle. Therapy with irritant side effects and contact dermatitis, scalp allergies. causes increased hair loss. Alternative therapy using secretome hypoxia mesenchymal stem cells (SH-MSCs) which is safe and effective is an option. Objective to determine the effect of topical administration of SH-MSCs gel on IL-10 and TNF- α gene expression in Wistar rats with a fluconazole-induced alopecia-like model.

Method: In vivo experimental research using a Post Test Only Control Group Design research design. This study used 4 groups, namely 2 treatment groups and intervention with a topical SH-MSCs gel dose of 20 μ L and a dose of 40 μ L, 1 treatment group that did not receive intervention (base gel control) and 1 group of healthy mice. Skin tissue analysis was carried out on day 22 to assess IL-10 and TNF- α gene expression using the RT-PCR method.

Results: IL-10 gene expression using the One way Anova test obtained a value of 0.00 ($p < 0.05$) so that there was a significant difference in IL-10 gene expression between groups in mice with the alopecia like model. The results of the TNF- α gene expression data with a value of 0.00 ($p < 0.05$) showed significant differences between treatment groups.

Conclusion: Administration of various doses of SH-MSCs topical gel increased IL-10 gene expression and decreased TNF- α gene expression in Wistar rats with a fluconazole-induced alopecia-like model, with the use of SH-MSCs topical gel at a dose of 40 μ L having the greatest effect. most significant compared to other groups.

Keywords: Alopecia like, SH-MHSCs topical gel, TNF- α , IL-10

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alopesia merupakan kelainan dermatologis yang disebabkan infeksi bakteri atau jamur, inflamasi, maupun disregulasi imun.¹ Gangguan ditandai dengan fase anagen yang lebih pendek dan fase telogen yang lebih panjang dalam siklus rambut.¹ Beberapa sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) mengoordinasikan pertumbuhan rambut siklus dalam patogenesis alopesia.^{2,3} Sel T patologis mengekspresikan IFN- γ dan IL-17 di awal penyakit, dengan peningkatan signifikan produksi sitokin IL-4 dan IL-10.³ Terapi topikal menggunakan minoksidil agar rambut dapat dipertahankan memberikan efek samping seperti iritan dan dermatitis kontak, alergi pada kulit kepala. Kasus reaksi alergi terhadap bahan non aktif propilen glikol ditemukan dalam beberapa larutan topikal yang mengandung galenik menyebabkan peningkatan kerontokan rambut selama penggunaan minoksidil.⁴ Perlu adanya terapi lain menggunakan *secretome*. Pendekatan terapi yang aman dan efektif, salah satunya dengan *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs).⁵ Penerapan terapi *secretome* terhadap alopesia masih sedikit data yang dilaporkan, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Dalam kasus alopesia 1-2% kebotakan menyebar diseluruh kulit kepala (Alopesia Totalis) atau ke seluruh epidermis (Alopesia Universalis). Kejadian Alopesia Areata dilaporkan 0,1-0,2% dengan kemungkinan risiko seumur hidup 1,7% pada pria dan wanita.⁶ Selama satu dekade pada studi prospektif mengamati

kejadian alopesia 0,7% terdapat pasien rawat jalan dengan dermatologi baru.⁷

Penelitian menunjukkan SH-MSCs mengandung berbagai sitokin anti inflamasi, seperti *transforming growth factor* (TGF- β), *interleukin-10* (IL-10).⁸ IL-10 dapat menghambat proses inflamasi melalui penahanan aktivasi NF κ B. Di sisi lain, TGF- β juga berperan dalam diferensiasi sel Th menjadi T-reg yang berperan penting dalam proses imunomodulasi.⁹ Terapi sekretom MSC telah terbukti menjadi pilihan baru untuk mengobati Alopesia, sel selubung akar luar berperan dalam menjaga struktur folikel rambut dan mendukung area tonjolan.¹⁰ Mempromosikan proliferasi folikel rambut dan mengurangi peradangan, dan menahan kerontokan rambut tikus pada alopesia.¹¹ *Secretome* MSC berfungsi sebagai sensor peradangan yang memiliki efek anti-inflamasi dan pro-inflamasi.¹² Pada penelitian lainnya, *Secretome* MSCs dalam kondisi peradangan akan mengaktifasi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan TGF- β , serta proliferasi molekul, terutama faktor pertumbuhan turunan trombosit (PDGF) dan faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) dengan media kultur terkondisi.^{12,13} Menggunakan gel topical SH-MSCs terbukti lebih efektif dari pada kombinasi injeksi subkutan pada hewan coba hari ke 6, kelompok topikal mengalami peningkatan PDGF dan kepadatan fibroblas yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kombinasi menggunakan injeksi subkutan.¹⁴

Transplantasi rambut dapat menggantikan area kebotakan dengan rambut sehat, namun jumlah rambut tidak selalu cukup untuk penggantian pada pasien dengan kerontokan yang parah.¹⁵ Penggunaan gen, sel, dan jaringan sebagai sumber terapi baru merupakan salah satu ciri pengobatan modern. Kemajuan dalam

pengobatan regeneratif telah meningkatkan minat dalam penerapan sel punca ke jaringan yang direkayasa untuk menyusun kembali jaringan yang rusak dan mengembangkan terapi regeneratif untuk kulit.¹⁶ Dengan mengeluarkan TGF β 1, IL10, dan PGE2, sekretom MSC memiliki kapasitas untuk membuat sel iTreg dan memiliki kemampuan imunomodulator yang memodulasi lingkungan inflamasi.¹⁷ Faktor pertumbuhan melalui trombosit adalah salah satu dari beberapa faktor yang dapat mengatur pertumbuhan, diferensiasi, dan aktivasi sel dengan aktivasi kemotaksis, angiogenesis, dan proliferasi fibroblas.¹⁸ Temuan ini menunjukkan bahwa molekul terlarut yang dikeluarkan oleh sekretom MSC sebagai CM bisa menjadi salah satu perawatan penyembuhan yang paling efektif.¹⁴

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa sekretom MSC telah banyak digunakan untuk mempercepat penyembuhan luka melalui aplikasi topikal, yang terbukti efektif.¹⁹ Kemampuan immunosupresif sekretom MSC didasarkan pada produksi sitokin seperti TGF- β , IDO, NO, PGE2, IL-10, dan TSG-6.²⁰ IL-10 dan TGF- β 1 adalah sitokin antiinflamasi yang kuat yang membantu mengatur respons inflamasi yang berlebihan. IL-10, khususnya, meredam sinyal pro-inflamasi dengan menghambat pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti IFN-, IL-2, dan TNF- α .²¹ TNF- α adalah molekul stimulator aktif yang meningkatkan sekresi berbagai sitokin inflamasi. Sekretom MSC yang teraktivasi TNF- α menekan peradangan dengan menginduksi produksi IL10 dalam sel makrofag.²² Sebuah studi menemukan bahwa tingkat IL-10 menurun setelah 24 jam dengan infus intravena sekretom MSC pada tikus.²³ Co-Smad4 juga terlibat dalam mempromosikan produksi sel-T IL-10 dengan langsung mengaktifkan promotor IL-10.²⁴ MSC dengan kuat menghasilkan

sitokin lain atau faktor pertumbuhan, termasuk TGF- β , yang dibuktikan dengan pelepasan IL-10, Temuan ini mendukung penelitian sebelumnya yang melaporkan IL-10 meningkat pada 6 dan 12 jam kemudian menurun pada 24 jam.²²

Dalam penelitian ini, peneliti ingin melihat kemampuan gel topikal secretome hipoksia sel punca mesenkimal dosis 100 μ L/kgBB dan 200 μ L/kgBB terhadap kadar IL-10 dan kadar TNF- α dengan tikus alopesia pada hari ke 6 pasca inflamasi yang belum pernah dilaporkan untuk melihat gambaran kedua parameter IL-10 dan TNF- α dalam proses percepatan penyembuhan dan pertumbuhan rambut.

1.2 Rumusan Masalah Penelitian

Apakah terdapat pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi IL-10 dan TNF- α pada tikus *Wistar* dengan model alopesia like yang diinduksi *flukonazole*?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan TNF- α pada tikus *Wistar* dengan model alopesia like yang diinduksi *flukonazole*.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh gel topikal SH-MSCs pada dosis 20 μ L dan 40 μ L terhadap ekspresi gen IL-10 antara kelompok perlakuan dibanding kontrol.
- b. Membuktikan pengaruh gel topikal SH-MSCs pada dosis 20 μ L dan 40 μ L terhadap ekspresi gen TNF- α antara kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.4 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil
1 Ou KL, Kuo YW, Wu CY, et al. ²⁵	<i>The potential of a hair follicle mesenchymal stem cell-conditioned medium for wound healing and hair follicle regeneration.</i>	True Ekperimental. Posstest Only Control Design Uji luka gores, Analisis Proliferasi, Pewarnaan Histologi.	Hasil in vitro MSC-CM mempromosikan migrasi sel dermal dan meningkatkan proliferasi HFMSC dan keratinosit HaCaT, menunjukkan sifat penyembuhan luka. MSC-CM mempromosikan migrasi dan proliferasi keratinosit dermal yang bermanfaat untuk penyembuhan luka dan pertumbuhan rambut.
2 Bak DH, Choi MJ, Kim SR, et al. ²⁶	<i>Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells engineered to overexpress growth factors accelerate outcomes in hair growth.</i>	True Ekperimental. Posstest Only Control Design Pewarnaan imunofluoresensi, Western blotting, dan Uji ELISA	Kultur bersama hUCB-MSCs meningkatkan viabilitas dan protein terkait induksi rambut yang diatur dari sel papilla dermal manusia. Melalui lokalisasi IGF-1 dan IGFBP-1, memiliki efek positif pada viabilitas sel, sekresi VEGF, ekspresi alkaline phosphatase (ALP), CD133, β -catenin. Pembentukan sferoid 3D hDPC. data menunjukkan hUCB-MSC meningkatkan pertumbuhan rambut melalui mekanisme parakrin.
3 Kuntardjo N, Dharmana E, Chodidjah C, Nasihun TR, Putra A. ¹⁴	<i>TNF-α-Activated MSC-CM Topical Gel Effective in Increasing PDGF Level, Fibroblast Density, and Wound Healing Process Compared to Subcutaneous Injection Combination.</i>	True Ekperimental. Posstest Only Control Design Uji ELISA	Menggunakan MSC-CM dalam gel topikal 100 μ L dan 200 μ L dibandingkan MSC-CM dalam injeksi subkutan: gel topikal= 80 μ L:20 μ L; 160 μ L:40 μ L Ditemukan bahwa terdapat peningkatan yang signifikan pada PDGF dan kepadatan fibroblas pada hari ke 6 pada kelompok topikal bila dibandingkan dengan kelompok kombinasi.

4	Deng W, Zhang Y, Wang W, et al. ¹¹	<i>Hair follicle-derived mesenchymal stem cells decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce inflammation around the hair follicle. Stem Cell Res Ther.</i>	True Ekperimental. <i>Posstest Only Control Design</i> Pewarnaan imunohistokimia, Western blot, RT-qPCR	Gejala mirip AA berkurang ketika model AA in vitro yang diinduksi IFN- γ dikultur bersama dengan HF-MSC selama 2 hari, model mencit C3H/HeJ AA yang dicangkokkan kulit diinjeksi dengan 106 HF MSCs seminggu sekali selama 3 minggu. HF-MSCs secara signifikan menurunkan kerontokan rambut tikus dan mengurangi peradangan di sekitar HF baik secara in vitro dan in vivo.
5	Thompson GR, Krois CR, Affolter VK, et al. ²⁷	<i>Examination of Fluconazole-Induced Alopecia in an Animal Model and Human Cohort.</i>	True Ekperimental. <i>Posstest Only Control Design</i> Kohort Histopatologi, Metode imunofluoresensi, dan PCR.	Model tikus dengan alopecia yang diinduksi flukonazol, menggambarkan jenis kerontokan rambut pada telogen effluvium dengan model hewan dan kohort manusia, mengilustrasikan resolusi alopecia dengan alternatif perubahan ke agen triazol.

Penelitian terdahulu melaporkan menggunakan subjek manusia dan hewan tikus dengan alopecia yang diinduksi flukonazol, menggambarkan jenis kerontokan rambut pada telogen effluvium, mengilustrasikan resolusi alopecia dengan alternatif perubahan ke agen triazol.²⁷ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana menggunakan gel topikal SH-MSCs akan ditreatment pada tikus alopecia dan dianalisa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α .

Penelitian dengan model in vitro organ folikel rambut seperti AA dengan pra-perawatan folikel vibrissa tikus dengan IFN- γ . Gejala mirip AA berkurang ketika model AA in vitro yang diinduksi IFN- γ dikultur bersama dengan HF-MSC selama 2 hari, model mencit C3H/HeJ AA yang dicangkokkan kulit diinjeksi

dengan 106 HF MSCs seminggu sekali selama 3 minggu, menggunakan HF-MSCs secara signifikan menurunkan kerontokan rambut tikus dan mengurangi peradangan di sekitar HF. HF-MSCs secara signifikan menurunkan kerontokan rambut tikus dan mengurangi peradangan di sekitar HF baik secara in vitro dan in vivo.¹¹ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana menggunakan gel topikal SH-MSCs akan ditreatment pada tikus alopesia dan dianalisa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α .

Penelitian melaporkan kultur bersama hUCB-MSCs meningkatkan viabilitas dan protein terkait induksi rambut yang diatur sel papilla dermal manusia (hDPCs), IGFBP-1 dan VEGF. IGFBP-1, melalui IGF-1 dan IGFBP-1, memiliki efek positif pada viabilitas sel, sekresi VEGF, ekspresi alkaline phosphatase (ALP), CD133, dan β -catenin, dan pembentukan sferoid 3D hDPC.²⁶ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana menggunakan gel topikal SH-MSCs akan ditreatment pada tikus alopesia dan dianalisa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α .

Penelitian lainnya melaporkan terdapat peningkatan yang signifikan pada PDGF dan kepadatan fibroblas pada hari ke 6 pada kelompok topikal bila dibandingkan dengan kelompok kombinasi, disimpulkan bahwa gel topikal MSC-CM lebih efektif dari pada kombinasi injeksi topikal-subkutan dalam proses penyembuhan luka.¹⁴ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana menggunakan gel topikal SH-MSCs akan ditreatment pada tikus alopesia dan dianalisa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α .

1.5 Manfaat Penelitian

- a. Sebagai informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi IL-10 dan TNF- α pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole*.
- b. Pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi IL-10 dan TNF- α pada tikus *Wistar* dengan model *alopesia like*. Dapat menjadi alternatif terapi penanganan alopesia yang diinduksi *flukonazole*.



BAB II

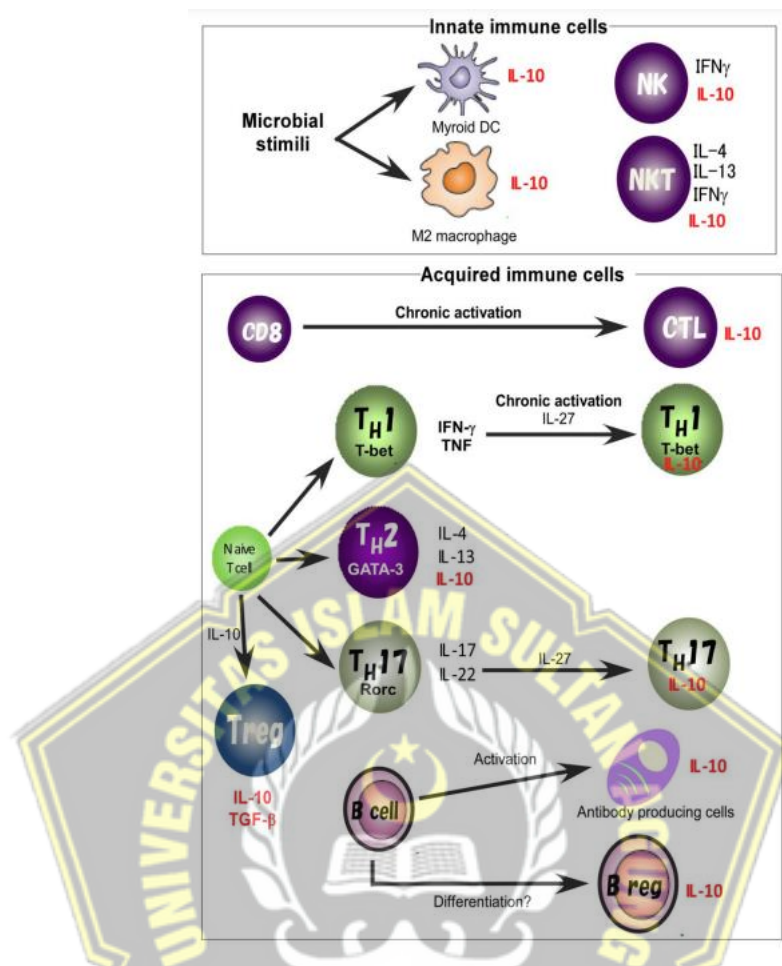
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Interleukin 10 (IL-10)

2.1.1 Pengertian

IL-10 merupakan sitokin anti inflamasi, Faktor penghambat sintesis sitokin manusia (CSIF), reseptor IL-10 terdiri atas IL-10 protein reseptor 1 dan IL-10 protein reseptor 2. Reaksi IL-10 menginduksi sinyal STAT3 masing2 oleh JAK1 dan Tyk2.²⁸ Protein IL-10 memiliki Panjang 178 asam amino.²⁹ IL-10 dikelompokkan menjadi sitokin kelas 2, yaitu IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 (Mda-7), IL-26, interferon tipe-I (IFN-alpha, beta, epsilon, kappa, dan omega), tipe-II (IFN-gamma), dan tipe-III (IFN-lambda).³⁰ Juga disebut sebagai IL-28A, IL-28B, dan IL-29.³¹

Sitokin IL-10 dengan sifat antiinflamasi terlibat dalam patogenesis berbagai penyakit. IL-10 awalnya digambarkan sebagai sitokin turunan T helper (TH2), penelitian lebih lanjut menunjukkan IL-10 diekspresikan tidak hanya oleh sel sistem imun adaptif sel T dan B, tetapi juga oleh sel imun bawaan yaitu sel dendritik (DC), makrofag, sel mast, dan NK sel. IL-10 diinduksi oleh sel Th1 dan Th17 oleh peradangan kronis sebagai sistem pengatur umpan balik.



Gambar 2.1 Jalur sekresi IL-10.³²

IL-10 disekresi oleh banyak sel imun yang didapat yaitu sel Th1, Th2, Th17, sel Treg, sel T CD8⁺ dan sel B. Regulasi IL10 dalam sel T dan sel B, kombinasi dari banyak faktor transkripsi, termasuk GATA-3, E4BP4, MAF, Blimp1, dan lainnya, mengatur ekspresi IL10 dalam subset sel-T yang berbeda pada jumlah yang bervariasi sesuai dengan fase pengembangan yang telah ditentukan.³² Ekspresi gen IL10 memiliki kelenturan dan plastisitas. Plastisitas ini terkadang dikendalikan oleh stimulasi antigen secara menerus oleh lingkungan sitokin tertentu seperti IL-27 turunan DC, dan secara selektif terjadi pada sel T helper tipe inflamasi, sel TH1 dan TH17. IL-10 dari sel B diketahui

pada beberapa model penyakit autoimun dan inflamasi. Sama dengan sel T, kompleks beberapa jalur pensinyalan, termasuk jalur BCR dan CD40-CD40L, diperlukan untuk pembentukan Breg dan induksi IL-10 dalam sel B.³²

IL-10 adalah salah satu sitokin yang berfungsi menurunkan berbagai respon inflamasi yang dimediasi oleh sel limfoid dan myeloid.³³ IL-10 awalnya diidentifikasi sebagai faktor penghambat sintesis sitokin (CSIF). Itu disekresikan dari Th2 dan menekan fungsi diferensiasi dan efektor sel Th1.³⁴

Fungsi penghambatannya dijelaskan oleh kemampuannya untuk menekan produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-12 dan TNF oleh DC dan makrofag, dan untuk menurunkan regulasi ekspresi MHC II dan molekul kostimulatori CD80 dan CD86 pada sel penyaji antigen (APC), sehingga menghasilkan penghambatan selanjutnya dari aktivasi sel T.^{33,34}

2.1.2 Peran IL-10 pada penyakit alopesia

Sitokin Th1 dan Th17 memicu serangan pada folikel rambut yang mengakibatkan penghentian prematur dari siklus pertumbuhan rambut dan induksi fenotipe alopesia dan selanjutnya menyebabkan terjadinya penyakit, sementara jalur Th2 mungkin berperan dalam penghambatan serangan imun yang dimediasi sel untuk menunda perkembangan penyakit.³⁵ Sel Treg berperan penting dalam menginduksi dan pemeliharaan toleransi terhadap self-antigen dan pencegahan autoimunitas, menghasilkan sitokin anti-inflamasi (TGF- β dan IL-10) dan mengatur fungsi sitokin pro-inflamasi.³⁶

IL-10 memiliki efek meregulasi dari pada efek stimulasi pada proses imunitas, menghambat produksi sitokin sel T yang diaktifkan. Peningkatan

kadar IL-10 pada alopesia areata dibandingkan dengan kontrol sehat, peran IL-10 sulit dipresentasikan karena bentuk terpisah antara jalur Th2 dan Treg.³⁶ Penelitian melaporkan pada model hewan, peran IL-10 dalam perkembangan penyakit. Kadar IL-10 pada serum tidak ada perbedaan kadar dibandingkan dengan dengan kontrol.^{35,37} Sedangkan penelitian lainnya peningkatan IL-10 pada AA dibandingkan dengan kontrol sehat, menunjukkan bahwa IL-10 mungkin bertindak sebagai sitokin Treg dan bukan sebagai molekul efektor dari jalur Th2, menghasilkan lokalisasi penyakit dengan sebagian besar hasil skor SALT yang rendah.³⁶

Perbandingan antara kelompok AA dan kelompok kontrol pada Th2, sitokin IL-10 dan IL-13 yang merupakan anti-inflamasi, peran dan keterlibatannya dalam patogenesis AA dalam penelitian sebelumnya dilaporkan kadar mRNA IL-10 darah tepi ditemukan sebanding, penelitian menemukan kadar serum IL-10 yang sebanding pada kelompok AA aktif dan kelompok kontrol. Tingkat IL-13 ditemukan secara signifikan lebih tinggi pada pasien dengan AA aktif dibandingkan dengan kelompok kontrol. Disimpulkan bahwa, tidak ada hubungan antara kadar serum IL-10 dan IL-13 dibandingkan durasi AA dan jumlah bercak pada kulit kepala.³⁵

Hasil ini mendukung kemungkinan peran yang sangat penting pada jalur Treg melalui IL-10 dalam lokalisasi penyakit dengan menekan Th1 dan Th17, dilaporkannya jalur Th2 ditekan pada AA aktif menegaskan hubungan antara Th1 dan Th2 dimana salah satunya dominan dalam patogenesis suatu penyakit.³⁵

2.2 Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)

2.2.1 Pengertian TNF- α

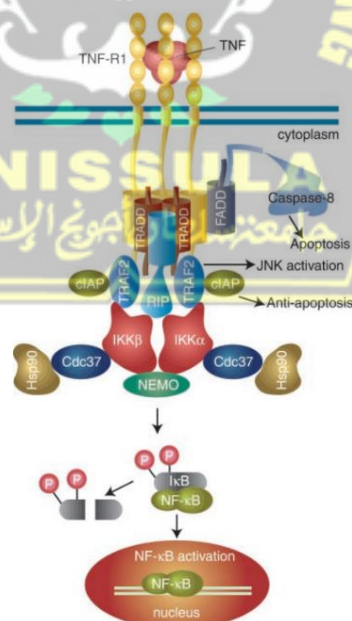
TNF adalah homotrimer dengan 157 subunit asam amino yang sebagian besar diproduksi oleh makrofag aktif, TNF diaktifkan melalui dua reseptor permukaan sel yang berbeda yaitu TNF-R1 dan TNF-R2. TNF-R1 telah ditemukan sebagai inisiator utama sebagian besar tindakan biologis, dua faktor transkripsi penting faktor nuklir κ B (NF- κ B) dan c-Jun, diaktifkan sebagai hasil pengikatan TNF ke TNF-R1, yang memicu rangkaian proses intraseluler. Faktor-faktor transkripsi ini bertanggung jawab atas ekspresi gen yang dapat diinduksi penting untuk beberapa proses biologis, seperti pembelahan dan pertumbuhan sel, perkembangan, onkogenesis, dan respons imunologis, inflamasi, dan stres.³⁸

2.2.2 Jalur Aktivasi TNF- α

Langkah awal trimer TNF berikatan dengan domain ekstraseluler TNF-R1 dan menyebabkan domain intraseluler (ICD) dari reseptor untuk melepaskan penghambat domain peredam kematian protein (SODD), yang memulai pensinyalan TNF. ICD TNF-R1 gabungan yang dihasilkan dikenali oleh domain kematian protein adaptor terkait reseptor TNF (TRADD), yang kemudian menarik protein adaptor tambahan berinteraksi dengan reseptor (RIP), faktor terkait TNF-R 2 (TRAF2), dan Fas domain kematian terkait (FADD). Protein terakhir pembawa enzim untuk TNF-R1 yang bertanggung jawab untuk memulai peristiwa pensinyalan. Misalnya caspase-8 direkrut oleh FADD ke kompleks TNF-R1, di mana akan menjadi aktif dengan pembelahan

diri dan menginisiasi protease kaskade yang mengarah ke apoptosis.³⁸

TRAF2 merekrut penghambat seluler dari apoptosis protein-1 (cIAP-1) dan cIAP-2, dua protein anti apoptosis yang juga memiliki ubiquitin protein ligase aktivitas. TRAF2 juga diduga mengaktifkan protein kinase mitogen yang diatur sinyal ekstraseluler kinase 1 (MEKK1) atau distimulasi oleh apoptosis kinase 1 (ASK1), di kompleks di atau dekat reseptor, sehingga mengaktifkan kaskade kinase yang menghasilkan aktivasi c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), sebuah kinase yang memfosforilasi c-Jun dan meningkatkan aktivitas transkripsinya. Terakhir, protein kinase RIP sangat penting untuk fungsi ketiga dari jaringan pensinyalan TNF, yaitu aktivasi faktor transkripsi NF- κ B. Aktivitas enzimatis RIP tidak diperlukan untuk aktivasi yang diinduksi TNF NF- κ B.³⁸



Gambar 2.2 Jalur transduksi sinyal TNF.³⁸

TNF berinteraksi dengan TNF-R1, SODD dilepaskan dan kompleks reseptor proksimal yang meliputi protein adaptor penting TRADD, TRAF2, RIP, dan FADD akan terbentuk. Protein Adaptor ini kemudian membawa enzim khusus jalur kunci tambahan seperti (*caspase-8* dan IKK), ke kompleks TNF-R1 tempat mereka menjadi aktif dan memulai proses yang menghasilkan apoptosis, aktivasi NF- κ B, dan aktivasi JNK.³⁸

Tumor necrosis factor (TNF) dikaitkan dengan patofisiologi berbagai gangguan, merupakan modulator kunci apoptosis, serta peradangan dan kekebalan.³⁸ Sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 α/β dan TNF- α ditandai peningkatan kadar lebih tinggi pada gangguan autoimun.³⁹

2.2.3 Hubungan ekspresi TNF- α dengan alopecia

Menurut penelitian dengan menggunakan pemeriksaan *flow cytometry* melaporkan peningkatan kadar TNF- α pada model tikus dan PBMC manusia.^{39,40} Data studi laboratorium sejalan dengan ini dan mengkonfirmasi up-regulasi TNF- α menggunakan ELISA pada sampel serum manusia. Namun, kelompok lain tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan, terutama pada jaringan kulit kepala manusia dan sampel PBMC.³⁹

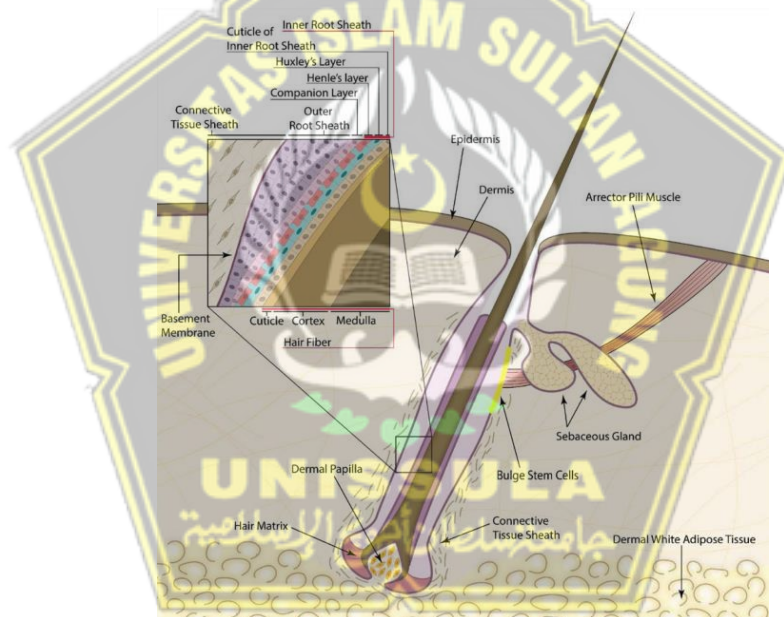
Sitokin proinflamasi meningkat dalam serum, tetapi tidak bermigrasi ke jaringan kulit kepala, kemungkinan sitokin tidak memainkan peran utama dalam perkembangan alopecia, penelitian menunjukkan kurangnya efek terapi anti-TNF- α pada regresi penyakit.⁴¹ Ekspresi klinis *alopecia areata* dialami pada beberapa pasien yang diobati dengan inhibitor TNF- α untuk kondisi autoimun lainnya.⁴² Menunjukkan peran protektif TNF- α di *alopecia areata*. Penyelidikan

lebih lanjut akan diperlukan untuk menjelaskan peran potensial $\text{TNF-}\alpha$ dalam pengembangan atau penghambatan alopesia.³⁹

2.3 Rambut

2.3.1 Pengertian

Rambut adalah filamen protein yang berasal dari folikel di dalam dermis dan sebagian besar terbuat dari keratin. Rata-rata orang memiliki sekitar 5 juta helai rambut di tubuhnya dan sekitar 100.000 folikel rambut di kulit kepalanya.⁴³



Gambar 2.3 Struktur lapisan rambut.⁴⁴

Batang rambut terdiri dari tiga lapisan yaitu medulla, korteks dan kutikula. Medula berada di tengah, korteks yang merupakan badan utama dari batang rambut, dan kutikula merupakan lapisan luar keras yang terbuat dari sel-sel keratin yang tumpang tindih dan bertindak sebagai penutup pelindung batang rambut. Bagian medula dan korteks terdapat pigmen yang menghasilkan warna rambut.⁴³

2.3.2 Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan rambut

Rambut yang sehat adalah rambut yang bersih, tidak kering atau kusam, tidak bercabang di ujungnya, dan tidak mudah rusak atau rontok. Rambut halus, bersih, dan berkilau dengan ujung meruncing. Sementara keutuhan ujung rambut berhubungan dengan rambut kortikal, tekstur dan kilap rambut berhubungan dengan kualitas permukaannya.⁴⁵

Beberapa faktor yang dapat memengaruhi kesehatan rambut seperti kekurangan nutrisi, paparan panas, sinar UV, bahan kimia, polusi udara, penataan rambut (pengeritingan, pelurusan, penggunaan pengering rambut, pengencangan), maupun masalah kulit di kepala seperti tinea capitis, ketombe di kulit kepala dapat menyebabkan rambut lebih mudah rontok.⁴⁵

Beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan rambut, antar lain:

➤ Genetik

Faktor genetik dapat memengaruhi warna, pertumbuhan, dan kepadatan rambut.

➤ Usia

Pertumbuhan rambut terjadi paling cepat umur 15 tahun hingga umur 20 tahun.

➤ Nutrisi

Protein, zat besi, dan seng adalah nutrisi penting untuk kesehatan dan perkembangan rambut.

➤ Vaskularisasi

Aliran darah ke folikel rambut juga akan meningkatkan

pertumbuhan rambut.

➤ Hormon

Fluktuasi hormon adalah salah satu hal yang dapat mempengaruhi seberapa banyak rambut tumbuh.

➤ Bahan kimia dan obat

Paparan bahan kimia seperti dari warna rambut dapat menghambat perkembangan atau mengakibatkan kerontokan rambut.^{43,46}

2.3.3 Kerontokan rambut

Normalnya rambut akan terlepas dari kulit kepala hingga kurang lebih 100 helai setiap harinya, dianggap tidak normal bila lebih banyak rambut rontok dari 120 helai setiap hari, kerontokan rambut difus dan lokal keduanya mungkin terjadi rambut unifokal atau multifokal.⁴³

Ada dua jenis kerontokan rambut (effluvium) yaitu telogen effluvium dan anagen effluvium.

➤ Telogen effluvium

Pada telogen effluvium folikel rambut normal, meskipun fase anagen dipersingkat. Jenis effluvium ini dapat mempengaruhi 50% pertumbuhan rambut, dapat berkembang akibat persalinan, demam pasca akut, penyakit kronis, malnutrisi, dan penggunaan obat-obatan tertentu.⁴⁷

➤ Anagen effluvium

Folikel rambut menipis dan berkerut pada fase anagen effluvium. Biasanya terjadi setelah kemoterapi. Jika obat dihentikan, aktivitas

folikel normal kembali setelah beberapa minggu.⁴⁷

Faktor yang menyebabkan kerontokan pada rambut, antara lain:

a) Penuaan

Rambut rontok adalah kejadian umum seiring bertambahnya usia.

Orang yang lebih tua memiliki tingkat pertumbuhan rambut yang lebih lambat, helai rambut yang lebih kecil, dan folikel rambut yang tidak lagi menghasilkan rambut baru.⁴³

b) Perubahan Hormonal

Beberapa wanita mengalami kerontokan rambut sementara setelah melahirkan akibat kadar estrogen yang lebih rendah, kerontokan rambut dapat terjadi setelah menopause karena penurunan kadar estrogen.⁴⁶

c) Hormon Dehidrotestosterone (DHT)

Enzim 5-alpha reductase tipe II membantu konversi testosteron menjadi DHT. DHT menyebabkan folikel rambut menyusut, menyebabkan rambut rontok dan berpotensi kebotakan dalam jangka panjang, pemendekan fase anagen juga merupakan hasil dari DHT.⁴⁸

d) Stres

Kerontokan rambut dapat disebabkan oleh peristiwa traumatis termasuk kematian orang yang dicintai, perceraian, atau stres emosional lainnya.⁴⁵

e) Penyakit

Kerontokan rambut dapat disebabkan oleh suhu tinggi, penyakit serius, diabetes, penyakit tiroid, atau anemia.

Kerontokan rambut bisa diatasi jika kondisi tersebut diatasi.^{43,45}

f) Obat-obatan

Meski bersifat sementara, kerontokan rambut dapat disebabkan oleh obat-obatan seperti pengencer darah, kemoterapi, radiasi, pil kontrasepsi, antidepresan, antigout, penyakit jantung, antihipertensi, steroid anabolik, dan dosis vitamin A yang berlebihan.^{43,45}

g) Defisiensi zat gizi

Kerontokan rambut yang disebabkan oleh penurunan berat badan yang sering dan berlebihan mungkin muncul tiga sampai enam bulan setelah penurunan berat badan. Untuk perkembangan rambut yang sehat dan pemeliharaan kekuatan rambut, protein sangat penting. Kerontokan rambut dapat terjadi jika terjadi kekurangan konsumsi protein yang berkepanjangan (2-3 bulan). Kekurangan zat besi juga dapat menyebabkan kerontokan rambut.⁴³

h) Perawatan rambut yang tidak tepat

Kerontokan rambut dapat dipicu oleh keramas, menyisir, atau menyisir rambut secara berlebihan. Begitu pula menyikat atau menyisir rambut yang masih basah, terutama dengan sisir bergigi jarang, dan menyeka rambut basah dengan handuk. Mayoritas orang bule dan Asia memiliki rambut yang lebih mudah rontok saat basah.⁴³

i) Perlakuan pada rambut

Penggunaan produk rambut seperti gel, semprotan, dan alat pengeriting rambut kondisi yang tidak sesuai dapat menyebabkan kerontokan rambut. Pelurusan, pengeritingan, dan pengeringan rambut dengan suhu tinggi dapat membuat rambut lebih rapuh dan mudah patah. Penggunaan jepit rambut dan gaya rambut yang ketat juga bisa merusak rambut.^{43,46}

j) Trikotilomania

Orang yang menderita penyakit ini memiliki dorongan yang terus-menerus untuk mencabut rambut dari kulit kepala. Bahkan beberapa pasien merasa wajib untuk menghilangkan alis, bulu hidung, dan bulu tubuh lainnya.⁴³

2.4 Sel Punca Mesenkimal (*Mesenchymal Stem Cell*)

Pengertian dari istilah *stem cell* adalah “stem artinya batang”, “sel artinya sel”, dan “sel punca” diartikan sebagai “sel yang menjadi titik awal pertumbuhan sel-sel lain yang menyusun semua organisme, termasuk manusia.” Sel punca adalah titik awal untuk produksi banyak sel tubuh, seperti halnya batang pohon yang berfungsi sebagai dasar pertumbuhan cabang dan daunnya. Sel induk adalah sel embrionik, janin, atau dewasa yang memiliki kapasitas untuk berkembang biak dalam waktu lama, tidak terspesialisasi dan mampu berkembang menjadi jenis sel tertentu yang membentuk jaringan dan sistem organ.⁴⁹

Sel punca mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

1. Sel induk yang memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi banyak jenis

sel. Dalam situasi ini, sel punca memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa, termasuk sel saraf, jantung, kerangka, dan pankreas.

2. Kemampuan memperbaharui atau memperbaharui diri sendiri (self-regenerate/self-renew). Dalam hal ini sel punca memiliki kemampuan untuk membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya sendiri melalui pembelahan sel.⁵⁰

Sel punca mesenkimal adalah strategi ideal untuk memperbaiki dan meregenerasi kelainan kulit. Terapi berbasis sel punca telah digunakan dalam pengobatan regeneratif di beberapa bidang medis, seperti ortopedi, neurologi, kardiologi, dan dermatologi. Ketika sel-sel ini tertanam dalam jaringan yang rusak, mereka cenderung bereaksi lebih baik terhadap faktor parakrin.⁵¹ HMSC dapat berkembang menjadi komponen jaringan yang terluka ketika sel-sel ini disuntikkan ke area yang terkena berbagai penyakit. Selain itu, sel-sel ini telah menunjukkan aktivitas imunomodulator yang signifikan dan memiliki kapasitas untuk mengeluarkan berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan, termasuk VEGF, bFGF, Il-6, Il-7, Il-8, dan EGF, yang semuanya membantu dalam promosi dari regenerasi jaringan.^{52,53}

HMSCs telah digunakan dalam sejumlah spesialisasi medis dan bedah untuk menyelidiki pilihan terapi baru untuk gangguan yang hasil teknik pengobatan yang ada tidak memuaskan. Misalnya, hMSC telah berhasil digunakan di sektor ortopedi untuk osteonekrosis, osteoarthritis, dan mendorong perbaikan patah tulang. 23-26 Perawatan luka dan borok kulit telah menjadi aplikasi utama hMSC dalam

dermatologi. Pada metode ini, pengobatan hMSC telah terbukti dalam uji praklinis mempercepat re-epitelisasi luka kulit. Ini adalah hasil dari pelepasan faktor pertumbuhan transformasi beta (TGF-beta) dan bFGF, yang keduanya secara langsung merangsang proliferasi fibroblast dermal. Selain itu, karena kemampuannya untuk berkembang menjadi adiposit, ia menawarkan landasan struktural untuk regenerasi kulit dan epitelisasi ulang.⁵⁴

Folikel rambut (HF) adalah mekanisme regenerasi yang secara alami melewati tiga fase: anagen, katagen, dan telogen. Di wilayah perlekatan otot arrektor pili, yang juga menampung melanosit dan sel punca epitel, HF menyediakan ceruk untuk sel punca dewasa, jenis sel punca yang berbeda. Sel papila dermal berasal dari kondensasi dermal selama tahap pertama perkembangan folikel rambut, adalah yang membentuk folikel rambut.⁴⁷ Pensinyalan antara keratinosit epitel, folikel rambut khusus di bawahnya, dan sel mesenkim papila dermal selama siklus HF dewasa menyebabkan sel induk berkembang biak dan memulai proses diferensiasi sel ke dalam garis keturunan sel folikel rambut. Regenerasi kelenjar sebaceous melibatkan sel-sel ini juga.⁵⁵

Faktor keturunan, kelainan hormonal, penyakit autoimun, kekurangan nutrisi, pertumbuhan bakteri dan jamur yang berlebihan, masalah psikologis, pengaruh lingkungan, dan penuaan hanyalah beberapa alasan yang mempengaruhi kerontokan rambut. Siklus rambut dipengaruhi oleh beberapa kondisi yang merugikan ini, yang juga menurunkan aktivitas sel punca dan potensi penyembuhan HF.⁵⁶ Kondisi imunologis yang menggunakan HF sebagai salah satu target utamanya. Limfosit T CD4 dan CD8 serta sel pembunuh alami (NK) mengelompok

di dekat autoantigen bulbus rambut ketika keistimewaan imunologi HF runtuh, yang menyebabkan munculnya AA.^{57,58}

Sejumlah model telah menunjukkan hubungan antara gangguan sitokin dan protein tertentu dan timbulnya berbagai jenis alopecia. Paling sering ditemukan pada AA, sitokin dan kemokin Th1 seperti interferon-gamma (IFN- γ), CXCL9, dan CXCL10 dapat menyebabkan kolapsnya folikel rambut imunologis kanan.⁵⁸ Berbeda dengan mereka yang memiliki AHA, orang dengan AA aktif mengalami penurunan imunoreaktivitas penanda telogen CK15. AHA menyebabkan defisiensi CD34 pada folikel rambut di bagian depan kulit kepala, sedangkan ekspresinya masih terdapat pada folikel rambut di area oksipital. Sediaan PRP yang terdiri dari sel CD34+ autolog telah menunjukkan dampak terapeutik yang menguntungkan pada pasien AHA bila diberikan secara intrafollicular.^{59,60} Selain itu, *patchy alopecia* memiliki ekspresi CD200 yang tidak memadai, penanda sel matriks yang berbeda, yang mungkin merupakan gejala hilangnya hak istimewa kekebalan dan berkontribusi pada patofisiologi kondisi tersebut.^{61,62}

Sudah diketahui bahwa garis Wnt dan pensinyalan Wnt/beta-catenin meningkatkan perkembangan rambut mamalia. LeirHais dkk. menemukan bahwa androgen menekan jalur Wnt, yang pada gilirannya menderegulasi komponen yang dilepaskan oleh sel papilla dermal yang terlibat dalam perkembangan sel induk HF normal.⁶³

2.4.1 Penelitian sel punca mesenkimal pada rambut

Studi praklinis menggunakan HMSC menunjukkan hasil menjanjikan dengan dalam pengobatan AA dan AHA. Dampak imunomodulator MSC pada

AA melalui pengembangan studi percontohan pada tikus C3H/HeJ yang diinduksi AA, pemberian MSC intravena pada hari 1 dan 7. Setelah 15 minggu masa tindak lanjut, 23% dari kelompok yang diobati dengan MSC masih mengalami kejadian AA, sedangkan 91% dari hewan pada kelompok kontrol mengalami kerontokan rambut yang signifikan. Konsentrasi IFN, CXCL9, dan CXCL10 dalam sampel serum pada kelompok perlakuan juga lebih rendah. Selain itu, pemeriksaan histologis menunjukkan penurunan infiltrasi seluler inflamasi pada papila dermal.⁵⁷

Penelitian *in vitro* menguji bagaimana hMSC mempengaruhi kelangsungan hidup dan pertumbuhan sel papilla dermal manusia (hDPC) dalam model AA dengan mengaktifkan jalur pensinyalan JAK/STAT dan Wnt/beta-catenin. Menggunakan hMSC dari sumsum tulang yang dikultur bersama dengan hDPC dapat meningkatkan proliferasi hDPC sebesar 120% jika dibandingkan dengan hDPC yang dikultur sendiri. Selain itu, pengobatan hMSC meningkatkan kadar beta-catenin dan menyebabkan fosforilasi protein STAT1 dan STAT3 yang jauh lebih tinggi, terkait dengan fase anagen yang berlarut-larut. Akhirnya, dengan memulihkan hak istimewa HF yang menyebabkan pensinyalan masuk kembali dari fase telogen ke fase anagen.¹⁶

2.5 *Secretome* MSC

Sel non-hematopoietik yang dikenal sebagai sel punca mesenkim adalah sel yang menempel dan menunjukkan penanda permukaan CD90, CD105, dan CD73 tetapi tidak mengekspresikan CD14, CD34, atau CD45. Secara *in vitro*, sel-sel ini juga dapat berkembang menjadi adiposit, kondrosit, dan osteoklas. Sel induk

mesenchymal awalnya ditemukan di sumsum tulang meskipun studi awal di akhir 1960-an, tetapi penelitian yang lebih baru menunjukkan bahwa sel-sel ini dapat diisolasi dari berbagai jaringan, termasuk jaringan adiposa, jantung, jeli Wharton, pulpa gigi, darah tepi, darah dari tali pusar, darah menstruasi, dan vili korionik.⁶⁴ Kebutuhan fisiologis sel induk mesenchymal dalam kultur lapisan tunggal, di mana mereka melepaskan sitokin, mikroRNA (miRNA), eksosom, dan mikrovesikel, adalah yang mendorong aktivitas terapeutik mereka. Gagasan bahwa sel induk mesenchymal bekerja sebagai "sel perbaikan" tubuh menyiratkan bahwa sel-sel ini melepaskan beberapa zat yang bersifat regeneratif dan bergantung pada stimulus. Sekresi faktor terapeutik dipromosikan dengan penambahan sejumlah rangsangan ke media kultur, termasuk hipoksia prakondisi, penambahan rangsangan peradangan, dan pengembangan sel kultur dalam susunan tiga dimensi.⁵

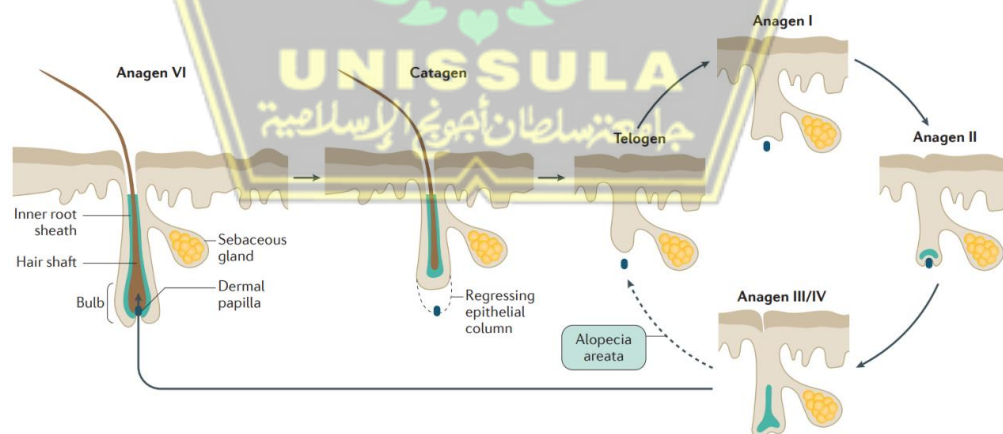
Sebelum sekresi MSC dapat digunakan secara luas di klinik sebagai terapi baru yang potensial, mekanisme kerja dari proses tersebut harus diklarifikasi. Penemuan terbaru dalam biologi sel dan molekuler telah menjelaskan sejumlah jalur, dan telah dihipotesiskan bahwa sekresi MSC dapat membantu penyembuhan luka. Banyak protein yang terlibat dalam peradangan kulit, hemostasis, dan penyembuhan luka ditemukan setelah sekresi MSC dibedah. Jalur dan mekanisme aksi biokimia protein ini telah ditemukan.⁶⁵

Terapi penyakit inflamasi pada sistem saraf, kardiovaskular, paru, dan kerangka telah terbukti secara signifikan mendapat manfaat dari penggunaan sekresi MSC, yang merupakan campuran kompleks zat bioaktif.⁶⁶ Meskipun interaksi sel-sel langsung mungkin diperlukan agar sel memiliki efek antiinflamasi,

banyak penelitian telah menunjukkan bahwa interaksi antara sel imun dan MSC dapat dijelaskan oleh sitokin yang dilepaskan oleh MSC. Rute dan mekanisme aksi biokimia protein ini telah diidentifikasi.¹⁴

2.6 Alopecia Areata

Alopecia areata (AA) merupakan kelainan autoimun, ditandai dengan kerontokan rambut secara merata pada kulit kepala. Perubahan yang terjadi pada subpopulasi khusus sel T CD4⁺, yaitu sel Th1, Th2, Th17 dan sel T regulator (Treg) yang terlibat dalam gangguan autoimun. Peran imunitas dan sitokin yang dimediasi sel T diubah dalam patogenesis AA. Sel Th1 menghasilkan interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α dan IL-2, Sel Th2 menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13. Sel Th17 menghasilkan IL-17, IL-23 dan IL-6 dan Treg mensintesis *transforming growth factor* (TGF)- β dan IL-10.³⁵



Gambar 2.4 Siklus rambut.⁶⁷

Fase anagen (periode pertumbuhan rambut aktif) berlangsung dari beberapa minggu hingga beberapa tahun, sel-sel epitel di umbi rambut mengalami aktivitas mitosis yang intens dan berdiferensiasi saat bergerak ke

distal untuk membentuk serat rambut, selubung akar dalam yang mengelilinginya, dan lapisan dalam selubung akar luar.⁶⁷ Ketika pembelahan sel epitel berhenti, folikel memasuki fase katagen, di mana bagian bawah folikel berinvolusi akibat apoptosis dan ujung proksimal batang rambut mengalami keratinisasi untuk menciptakan struktur berbentuk gada yang akhirnya luruh. Fase telogen terjadi antara regresi folikel dan awal fase anagen berikutnya. Perkembangan folikel anagen mirip dengan perkembangan embrio folikel rambut, Anagen I hingga VI, dengan anagen VI menunjukkan folikel anagen yang berkembang sempurna.⁶⁸

Siklus folikel manusia secara independen dari tetangga terdekatnya, tidak seperti kebanyakan hewan, di mana siklus rambut terkoordinasi dalam pola seperti gelombang di atas kulit (gelombang mabung). Folikel anagen VI diendapkan pada awal fase telogen pada alopecia areata. Perkembangan folikel terhenti pada tahap anagen III/IV, meskipun faktanya mereka dapat memasuki Kembali ke fase anagen.^{69,70} Ketika mereka memasuki fase telogen secara premature, siklus yang terpotong dapat berlanjut selama aktivitas penyakit tidak meningkat dan folikel dapat berkembang lebih jauh ke fase anagen.⁶⁷

2.6.1 Manifestasi klinis Alopecia Areata

Kerontokan rambut yang tiba-tiba merupakan salah satu gejala klinis AA.⁷¹ Kulit terlihat normal, tidak ada indikasi peradangan atau bekas luka pada kulit yang terkena. Sebagian besar pasien AA tidak menunjukkan gejala, sementara beberapa pasien AA mungkin mengalami rasa gatal atau kesemutan ringan sebelum rambut rontok. Kulit kepala sering terkena (> 90%), sementara

bagian tubuh lain yang memiliki rambut seperti alis, bulu mata, janggut, rambut ketiak, dan rambut kemaluan juga dapat terkena.^{67,71}

Beberapa jenis/subtipe dari AA sebagai berikut:

a. Patchy alopecia

Tipe yang umum terjadi, berupa bercak tunggal atau multiple, dimana bercak dapat terpisah maupun menyatu membentuk pola retikular.

b. Alopecia Universal (AU)

Kerontokan total pada semua kulit kepala dan rambut pada tubuh.

c. Alopecia totalis

Kerontokan/kehilangan hampir seluruh total rambut.

d. Ophiasis

Kerontokan rambut yang muncul sebagai pita simetris di atas rambut temporal, parietal, dan oksipital kulit kepala dan biasanya resisten terhadap terapi.

e. Acute diffuse and total alopecia (EDTA)

Sebagian besar kulit kepala wanita mengalami kerontokan rambut yang tiba-tiba berkembang pesat menjadi kerontokan rambut total.

Kondisi ini dikaitkan dengan prognosis positif dan dapat segera sembuh dengan sendirinya, meski tanpa terapi.

f. Sisaipho

rambut rontok cukup banyak di bagian tengah kulit kepala, tetapi tidak banyak di sekitar tepinya

g. *Sindrom Marie Antoinette dan Thomas More*

Terjadinya pemutihan rambut dalam waktu semalam, rambut berpigmen diserang secara selektif dan rambut putih tetap berada dikulit kepala. Disebut *Sindrom Marie Antoinette* terjadi pada wanita dan sindrom *Thomas more* pada pria.

h. *Alopecia areata incognita* (AAI)

Penipisan rambut difus tanpa bercak khas, mirip efuvium telogen yang parah pada pasien dengan kepadatan rambut yang tampak normal. Penipisan rambut berkembang selama berbulan-bulan hingga bertahun dan area kebotakan berkembang pada beberapa pasien.⁷²



Gambar 2.5 Sub tipe Alopesia Areata.⁷¹

Keterangan pada gambar:

- a) Rambut rontok dengan bercak bulat yang khas untuk AA dan kulit yang tampak normal
- b) Beberapa tambalan kerontokan AA
- c) Pola retikular AA
- d) Afiasis
- e) Sisaipho

- f) Alopesia Universal
- g) Difus akut dan alopecia total
- h) Sindrom *Marie Antoinette*



BAB III

Kerangka teori, Kerangka konsep, dan Hipotesis

3.1 Kerangka teori

Alopesia merupakan kelainan dermatologis yang disebabkan infeksi bakteri atau jamur, inflamasi, maupun disregulasi imun.¹ Gangguan ditandai dengan fase anagen yang lebih pendek dan fase telogen yang lebih panjang dalam siklus rambut.¹ Beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan rambut, antar lain genetik usia, nutrisi, vaskularisasi, hormon, dan bahan kimia dan obat.^{43,46}

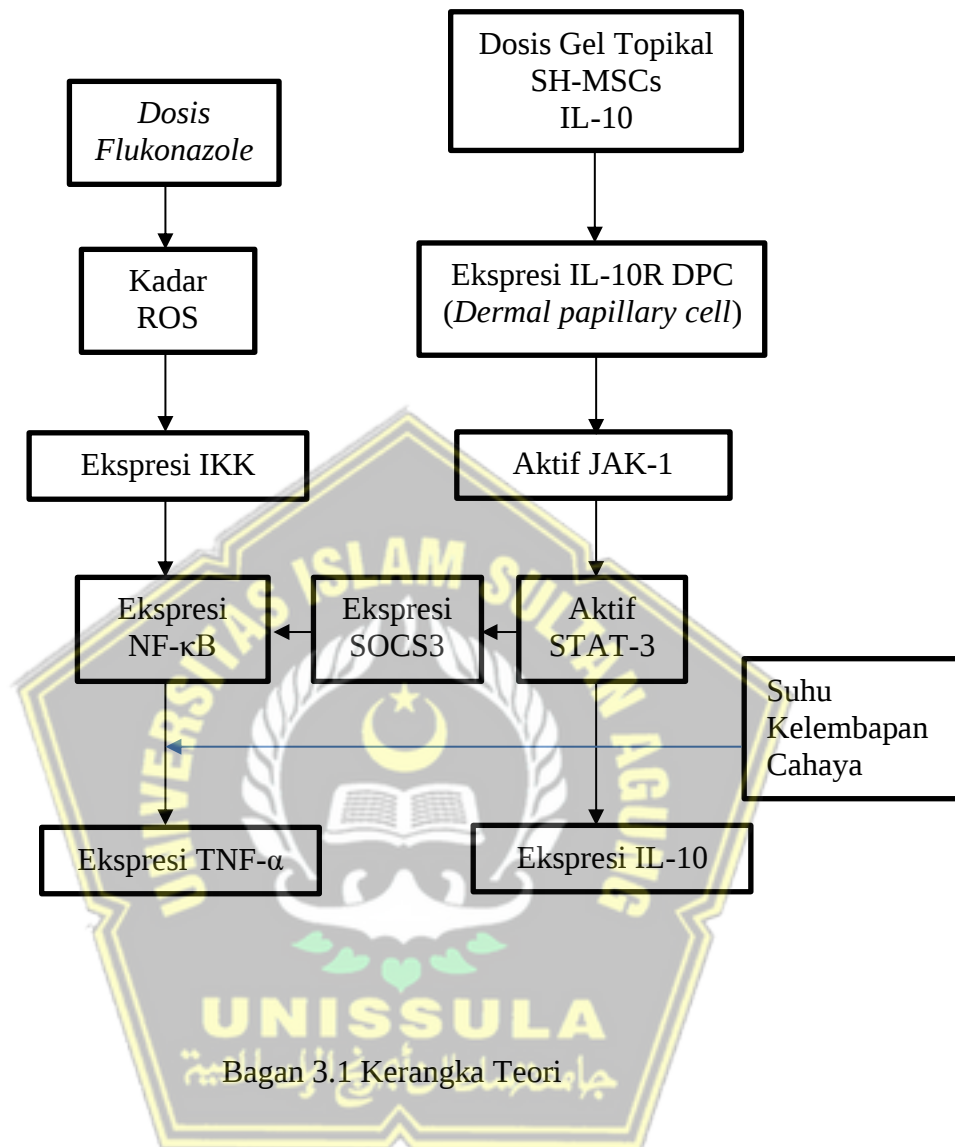
Faktor stimulasi dapat mengaktifkan sel T $CD8^+NKG2D^+$ dan menghasilkan IFN- γ melalui jalur JAK1 dan JAK3. IFN- γ dapat meningkatkan produksi IL-15 pada sel epitel folikuler melalui JAK1 dan JAK2. IL-15 kemudian berikatan dengan sel $CD8^+NKG2D^+$ T untuk menghasilkan lebih banyak IFN- γ , yang memperkuat loop umpan balik positif. IFN- γ mendorong keruntuhan hak istimewa kekebalan folikel rambut, yang mengarah pada pemaparan autoantigen ke sel $CD8^+NKG2D^+$ T dan memfasilitasi serangan autoimun pada folikel rambut. Sementara itu, sel inflamasi lainnya, seperti DC, sel $CD4^+T$, sel NK T, sel mast, dan eosinofil, akumulasi bermula di sekitar umbi rambut.⁷²

Sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) mengoordinasikan pertumbuhan rambut siklus dalam patogenesis alopesia.^{2,3} Sel T patologis mengekspresikan IFN- γ dan IL-17 di awal penyakit, dengan peningkatan signifikan produksi sitokin IL-4 dan IL-10.⁷³ Penerapan sel punca

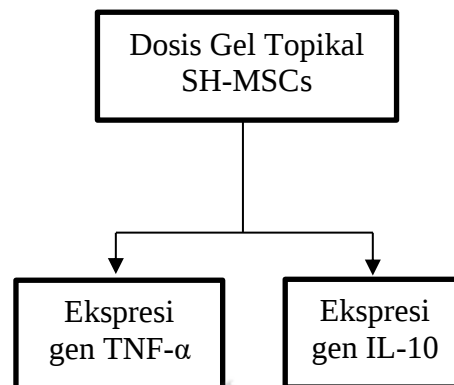
ke jaringan yang direkayasa untuk menyusun kembali jaringan yang rusak dan mengembangkan terapi regeneratif untuk kulit.¹⁶ Dengan mengeluarkan TGF β 1, IL10, dan PGE2, MSCs memiliki kapasitas untuk membuat sel iTreg dan memiliki kemampuan imunomodulator yang memodulasi lingkungan inflamasi.¹⁷ Faktor pertumbuhan melalui trombosit adalah salah satu dari beberapa faktor yang dapat mengatur pertumbuhan, diferensiasi, dan aktivasi sel dengan aktivasi kemotaksis, angiogenesis, dan proliferasi fibroblas.¹⁸

Kemampuan imunosupresif MSCs didasarkan pada produksi sitokin seperti TGF- β , IDO, NO, PGE2, IL-10, dan TSG-6.²⁰ IL-10 dan TGF- β 1 adalah sitokin anti inflamasi yang kuat yang membantu mengatur respons inflamasi yang berlebihan. IL-10, khususnya, meredam sinyal pro-inflamasi dengan menghambat pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti IFN-, IL-2, dan TNF- α .²¹ TNF- α adalah molekul stimulator aktif yang meningkatkan sekresi berbagai sitokin inflamasi. MSC yang teraktivasi TNF- α menekan peradangan dengan menginduksi produksi IL10 dalam sel makrofag.²² Co-Smad4 juga terlibat dalam mempromosikan produksi sel-T IL-10 dengan langsung mengaktifkan promotor IL-10.²⁴

Berdasarkan uraian diatas, dapat di buat kerangka teori sebagai berikut:



3.2 Kerangka konsep



Bagan 3.2 Kerangka konsep

3.3 Hipotesis Penelitian

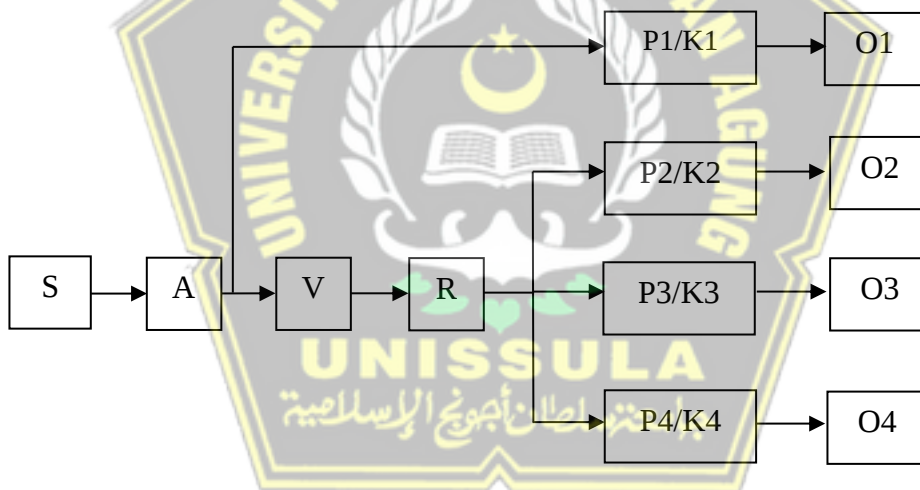
- a. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs pada dosis 20 μ L dan 40 μ L terhadap ekspresi gen IL-10 pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole*.
- b. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs pada pada dosis 20 μ L dan 40 μ L terhadap ekspresi gen TNF- α pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian menggunakan desain eksperimen *in vivo* dengan *Post Test Only Control Group*. Empat kelompok perlakuan dalam penelitian ini yaitu dua kelompok yang mendapat perlakuan dan intervensi, satu kelompok yang menerima pengobatan tetapi tidak ada intervensi (kelompok kontrol), dan satu kelompok tikus yang sehat. Setelah intervensi dilakukan pengukuran data.



Keterangan :

S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

Perlakuan : P1/K1: Tikus Sehat

Perlakuan : P2/K2: Kontrol Negatif (Tikus model *Alopecia like* dengan perlakuan base gel topical + NaCl 200 μ L)

Perlakuan : P3/K3: Tikus model *Alopecia like* dengan pemberian gel

topikal SH-MSCs dosis 20 μ L/tikus + NaCl 200 μ L)
 Perlakuan : P4/K4: Tikus model *Alopecia like* dengan pemberian gel
 topikal SH-MSCs dosis 40 μ L/tikus + NaCl 200 μ L)
 O : Observasi

4.2 Subyek dan sampel penelitian

4.2.1 Subyek penelitian

Subyek penelitian adalah tikus wistar jantan dengan berat badan 200 g dan berumur 2-3 bulan. Dokter hewan di Animal House SCCR, FK Unissula Semarang menilai tikus tersebut layak untuk digunakan dalam penelitian dengan terdapat kerontokan bulu pada tikus.

4.2.2 Sampel penelitian

4.2.2.1 Kriteria inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus putih galur *Wistar* jantan dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 8-12 minggu
2. Tikus kondisi Alopesia dengan kondisi kerontokan bulu dengan pemberian *Fluconazole* selama 14 hari yang divalidasi menggunakan pewarnaan HE dan pengamatan mikroskopis pada fase anagen effluvium terjadi pemendekan dibandingkan kelompok tikus sehat.
3. Bobot badan 200-250 g.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih galur *Wistar* jantan dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis tubuh.

2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tikus yang sakit sebelum masa penelitian.

4.2.2.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.2.3 Besar sampel

Besar sampel yang diperlukan dalam penelitian terdiri dari 4 kelompok perlakuan dengan total yaitu 24 ekor tikus *Wistar* jantan, didapat dengan menggunakan pedoman rumus sampel eksperimental dari Federer.⁷⁴

Dengan rumus sebagai berikut:

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

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

keterangan :

t = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel tiap perlakuan

4.3 Variabel dan definisi operasional

4.3.1 Variabel penelitian

4.3.1.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gel topikal SH-MSCs

dosis 20 μL dan dosis 40 μL .

4.3.1.1 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen IL-10 dan gen TNF- α .

4.3.2 Definisi operasional

4.3.2.1 Gel Topikal SH-MSCs

Gel topikal SH-MSCs adalah gel yang terkandung molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSC. Molekul larut meliputi faktor biologis aktif seperti sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan. Sekretom diperoleh dari medium hasil prekondisi MSC secara hipoksia, kemudian difiltrasi dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration*. SH-MSCs kemudian dicampur dengan gel sebanyak 0,5 g sebagai campuran. Gel sekretom terbagi menjadi beberapa kelompok yaitu kelompok P3 diberikan SH-MSCs dosis 20 μ L dan kelompok P4 diberikan SH-MSC dosis 40 μ L. Skala: Ordinal.

4.3.2.2 Ekspresi gen IL-10

IL-10 adalah gen yang memiliki peran dalam proses Alopesia melalui sekresi sitokin anti inflamasi akibat tingginya kadar ROS. Pengukuran ekspresi gen IL-10 jaringan kulit dilakukan pada hari ke 28 setelah perlakuan, dengan ekstraksi RNA untuk dianalisis menggunakan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk persentase.

Skala: Rasio

4.3.2.3 Ekspresi gen TNF- α

TNF- α adalah gen yang memiliki peran dalam proses Alopesia melalui sekresi sitokin pro inflamasi akibat tingginya kadar ROS. Pengukuran ekspresi gen TNF- α jaringan kulit dilakukan dengan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk persentase.

Skala: Rasio

4.4 Bahan penelitian

Bahan penelitian menggunakan bahan kultur yaitu tali pusat tikus, *dinitrophenyl-bovine serum albumin* (DNP-BSA), gel *aluminium hidroksida* (Al(OH)), 2,4-*Dinitrochlorobenzene* 1,5% (DNCB), aseton-minyak zaitun NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alkohol 70%, PBS, Ketamin, dan Xylasine, dan bahan lainnya seperti Aquades, NaCl 0,9%, Fungizon 0.5%, Streptomisin-penicilin 1% (penstrep), dan Povidon iodine.

4.5 Peralatan penelitian

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, *dissecting kit*, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan *hypoxic chamber*. Oxygen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber*. Selain itu, penelitian ini juga steril swab untuk mengoleskan gel topikal SH-MSCs. Alat yang digunakan untuk analisis

ekspresi gen IL-10 dan TNF- α seperti *Sentrifuge*, *Beaker glass*, *Cell counter*, Disposable pipet, Spuit 1 cc, Mikroskop cahaya, Alat cukur, Set alat bedah, Mikropipet, Masker, *Handscoon*, Kandang hewan coba, *Micropipette with tip* (blue tip, yellow tip, pink tip), Pipette filler, *Conical tube* (15 ml, 50 ml), *Biosafety*, *Inverted microscope*, *Cryotube* 1 ml, *Scissor*, dan Pinset.

4.6 Prosedur dan alur penelitian

4.6.1 *Ethical clearence*

Sebelum pelaksanaan penelitian, terlebih dahulu mengajukan *ethical clearence* ke komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.6.2 Cara penelitian

4.6.2.1 Tahap perlakuan tikus alopesia like dan validasi

Preliminary studi pada tikus model *alopesia like* menggunakan tikus sebanyak 6 ekor yang diaklamatisasi selama 7 hari, dibagi 4 kelompok masing-masing 3 ekor tikus yaitu kelompok sehat, kelompok sehat tercukur, kelompok yang diinduksi *flukonazole* tanpa dicukur, dan kelompok yang diinduksi *flukonaszole* yang dicukur. Setelah 14 hari perlakuan dilakukan validasi di hari 35mg ke 15 dengan melihat morfologi dan histopatologi dengan pewarnaan HE dan dilanjutkan dengan Analisa. Berikut alur Preliminary studi pada tikus model *alopesia like*:



Gambar 4.2 Bagan Alur Preliminary Study

4.6.2.2 Tahap pembagian kelompok perlakuan

Sampel penelitian menggunakan 24 ekor tikus *Wistar* jantan sesuai kriteria, diaklamatisasi selama 7 hari,

- Tikus wistar diberikan oral *fluconazole* 35mg/2ml/hari 14 hari
- Validasi kejadian alopesia dengan melihat morfologi dan histopatologi dengan pewarnaan HE.

Tikus Alopesia kemudian dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok tanpa perlakuan (Tikus sehat):

Diobservasi selama 1x24 jam setiap kelompok.

- Kelompok I: Tikus sehat tanpa perlakuan.

- Kelompok II: Tikus dengan Alopesia diolesi base gel/hari kemudian pada hari ke 6 jaringan kulit diambil untuk diperiksa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan metode RT-qPCR.
- Kelompok III: Tikus dengan Alopesia diberikan Gel topikal MSC dosis 20 μ L setiap hari sebanyak 1x pada pagi hari, hari ke 6 jaringan kulit diambil untuk diperiksa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan metode RT-qPCR.
- Kelompok IV: Tikus dengan Alopesia diberikan Gel topikal MSC dosis 40 μ L setiap hari sebanyak 1x pada pagi hari, hari ke 6 jaringan kulit diambil untuk diperiksa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan metode RT-qPCR.

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

Pengerjaan pada *biosafety cabinet class 2*, peralatan yang digunakan telah disterilisasi terlebih dahulu, Langkah-langkahnya sebagai berikut:

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, tali pusat dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibersihkan dengan PBS.
3. Pisahkan *Umbilical cord* dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. Cincang halus tali pusat, lalu distribusikan secara merata ke dalam labu 25T. Diamkan selama 3 menit agar tisu menempel pada permukaan labu.

5. Seluruh media (DMEM, fungizone, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara bertahap hingga jaringan tertutup.
6. Dalam inkubator yang diatur pada suhu 37°C dan 5% CO₂, transplantasi dikultur, sel akan muncul setelah 14 hari.
7. Medium diganti setiap 3 hari sekali dengan membuang separuh medium dan diganti dengan medium baru.
8. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%.

4.6.4 Proses Hipoksia

1. Kultur MSC yang mencapai 80% konfluensi ditambah medium komplet hingga 10 mL ke flask kemudian pindahkan ke dalam *hypoxic chamber*.
2. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam *chamber*.
3. Penambahan Nitrogen hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
4. *Chamber* yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
5. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan disaring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan SH-MSC yang selanjutnya dicampurkan dengan gel sesuai dengan dosis P3/K3 dan P4/K4.

4.6.5 Proses Pembuatan Sediaan Gel Topikal

1. Sekretom pada P3 dan P4 dikombinasikan dengan 200 mg gel untuk membuat sediaan gel SH-MSC.

2. Dalam keadaan aseptik, dilakukan pengadukan untuk menghasilkan campuran yang homogen berdasarkan ciri-ciri fisik yang terlihat di bawah mikroskop. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah mikroskop.

4.6.6 Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Selama enam hari, tikus menerima gel topikal yang mengandung 40 $\mu\text{L/kgBB}$ SH-MSK setiap hari. Gel dasar diberikan pada hewan kontrol negatif.
2. Untuk pembuatan preparat histologi dengan teknik parafin dan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE), diambil sampel kulit dari masing-masing kelompok.
3. Sampel kulit tikus diambil dari masing-masing kelompok dan diawetkan dalam larutan NBF 10%.
4. Sampel kulit dibersihkan dari sisa larutan fiksatif dengan membilasnya menggunakan alkohol 70%.
5. Untuk memulai proses dehidrasi, sampel kulit direndam dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan 100% masing-masing selama 30 menit.
6. Selama satu jam, rendam sampel kulit dalam toluol hingga bening atau bening. Infiltrasi ke dalam parafin dilakukan di dalam oven pada suhu 56-60°C dengan cara memasukkan sampel kulit ke dalam campuran toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-

masing selama 30 menit. Sampel kulit dimasukkan ke dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III masing-masing perlakuan selama 30 menit.

7. Proses infiltrasi ke dalam parafin dilakukan dengan memanaskan sampel kulit pada suhu 56–60°C dalam oven dan merendamnya selama 30 menit dalam larutan toluol dan parafin (1:1, 1:1, dan 3:1). Selama tiga puluh menit, sampel kulit diberi perlakuan parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III.
8. Penanaman : Setelah sampel kulit parafin murni dimasukkan ke dalam cetakan blok parafin yang telah diisi parafin cair, parafin dibiarkan hingga memadat.
9. Dengan menggunakan mikrotom, sampel kulit dalam blok parafin dipotong menjadi irisan setebal 6 μm .
10. Setelah potongan sampel jaringan direndam dalam sedikit air suling dan ditambahkan albumin Mayer, potongan tersebut ditempelkan pada kaca objek.
11. Sediaan histologis direndam selama 24 jam dalam xylol untuk melakukan deparaffinisasi.
12. Pewarna hematoksilin-eosin digunakan untuk pewarnaan. Kertas saring digunakan untuk menyerap kandungan xylol, kemudian ditambahkan alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30% satu per satu selama satu hingga dua menit dan air sulingan. Setelah direndam dalam pewarna hematoksilin selama lima sampai sepuluh

detik, sediaan dicuci selama sepuluh menit dengan air mengalir. Sediaan kemudian dicelupkan ke dalam alkohol dengan jumlah berbeda (30, 40%, 50%, 60%, dan 70%) masing-masing selama tiga sampai lima menit. Setelah dimasukkan ke dalam eosin selama lima sampai sepuluh menit, sediaan dicelupkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96% masing-masing selama tiga sampai lima menit, kemudian dikeringkan menggunakan kertas saring. Setelah 15 menit perendaman dalam xylol, sediaan dilakukan preparasi histologis.

13. Preparat ditutup kaca penutup, diberi label, dan disimpan dalam kotak sediaan.

4.6.6 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel kulit dimasukkan dalam tube berisi 300 μ L RNA later dan simpan pada suhu -20°C
2. Sampel kulit sebanyak 50 mg lalu dimasukkan dalam tube berisi 1ml trizol kemudian homogenkan dengan ultrasonikator dan inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit
3. Tambahkan 0,2 ml *Choloform* dan inkubasi pada suhu ruang 2-3 menit, sentrifus dengan kecepatan 2000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit
4. Hasil sentifus sampel membentuk 3 lapisan, sisi bawah bewarna merah muda mengandung protein, sisi tengah bewarna putih berisi DNA dan sisi atas bewarna bening berisi RNA (*aqueous phase*), pisahkan sisi atas ke tube yang berbeda

5. Sampel *aqueous phase* ditambah 0,5 mL isopropanol kemudian diresuspensi dan inkubasi selama 10 menit, lalu di sentrifugasi kecepatan 2000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit
6. Buang supernatan lalu tambahkan 1 mL etanol 70% untuk diresuspensi pada suhu 4 °C selama 5 menit
7. Tambahkan dengan 50 µL NFW (nuclease-free water)
8. Sampel RNA di kuantifikasi menggunakan µDrop dengan Panjang gelombang 260 nm dengan metode spektrofotometer
9. Sampel RNA sebanyak 0,1 ug dalam 1 µL NFW ditambahkan 5 µL NFW untuk denaturasi yang diinkubasi pada suhu 65 °C menggunakan *thermal cyclers* selama 5 menit
10. Tambahkan sampel RNA 2 µL 4x DN master mix kemudian inkubasi pada suhu 37°C dengan *thermal cyclers* selama 5 menit
11. Lanjutkan dengan proses *reverse transcription* dengan menambahkan 2 µL 4x DN master mix kemudian inkubasi pada suhu 37°C dengan *thermal cyclers* selama 15 menit, pada suhu 50°C selama 5 menit, dan suhu 98°C selama 5 menit menggunakan *thermal cyclers*.
12. Simpan sampel cDNA pada suhu -20°C

4.6.7 Pembacaan ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan *Real Time-*

Polymerase Chain Reaction (RTq-PCR)

1. Ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dianalisa pada RTq-PCR

2. Secara berurut campurkan 1 μL cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix sebanyak 10 μL , *primer forward* 0,8 μL dan *reverse primer* 0,8 μL dan NFW 7,4 μL .
3. Primer IL-10 yang digunakan adalah F: 5'-CTGTCACGGAGATCAATGTGG-3' dan R: 5'-AAGGCGTAGCTGAACAAGGTG-3'.
4. Primer TNF- α yang digunakan adalah F: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT -3 dan R: 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'.
5. Proses qPCR dilakukan pada suhu 95°C selama 2 menit, suhu 95°C selama 5 detik dan suhu 56°C selama 20 detik sebanyak 40 siklus, proses qPCR dilakukan untuk menganalisa probe terhidrolisis pada Panjang gelombang 520 nm
6. Kuantifikasi data qPCR dianalisa dengan menggunakan software EcoStudy.

4.7 Teknik pengumpulan dan Analisa data

Setelah data penelitian ini dibersihkan, dikoreksi, dan ditabulasi, dilakukan uji deskriptif yang melibatkan variabel independen dan dependen dengan menggunakan skala data rasio. Uji Shapiro-Wilk kemudian digunakan untuk memeriksa normalitas data, dan uji Levene digunakan untuk memeriksa varians data. Uji One Way Anova dilakukan terhadap parameter IL-10 karena diperoleh hasil sebaran data normal ($p>0,05$) dan varian data sama ($p>0,05$). Sedangkan uji One Way Anova digunakan karena temuan parameter TNF- α menunjukkan distribusi data normal ($p>0,05$) dan varian data homogen ($p>0,05$). Kelompok dosis yang paling signifikan kemudian diidentifikasi dengan melakukan uji Post Hoc LSD pada kedua parameter tersebut. Program desktop SPSS 26.0 for Windows digunakan untuk pengolahan data dalam penelitian.

4.8 Jadwal pelaksanaan penelitian

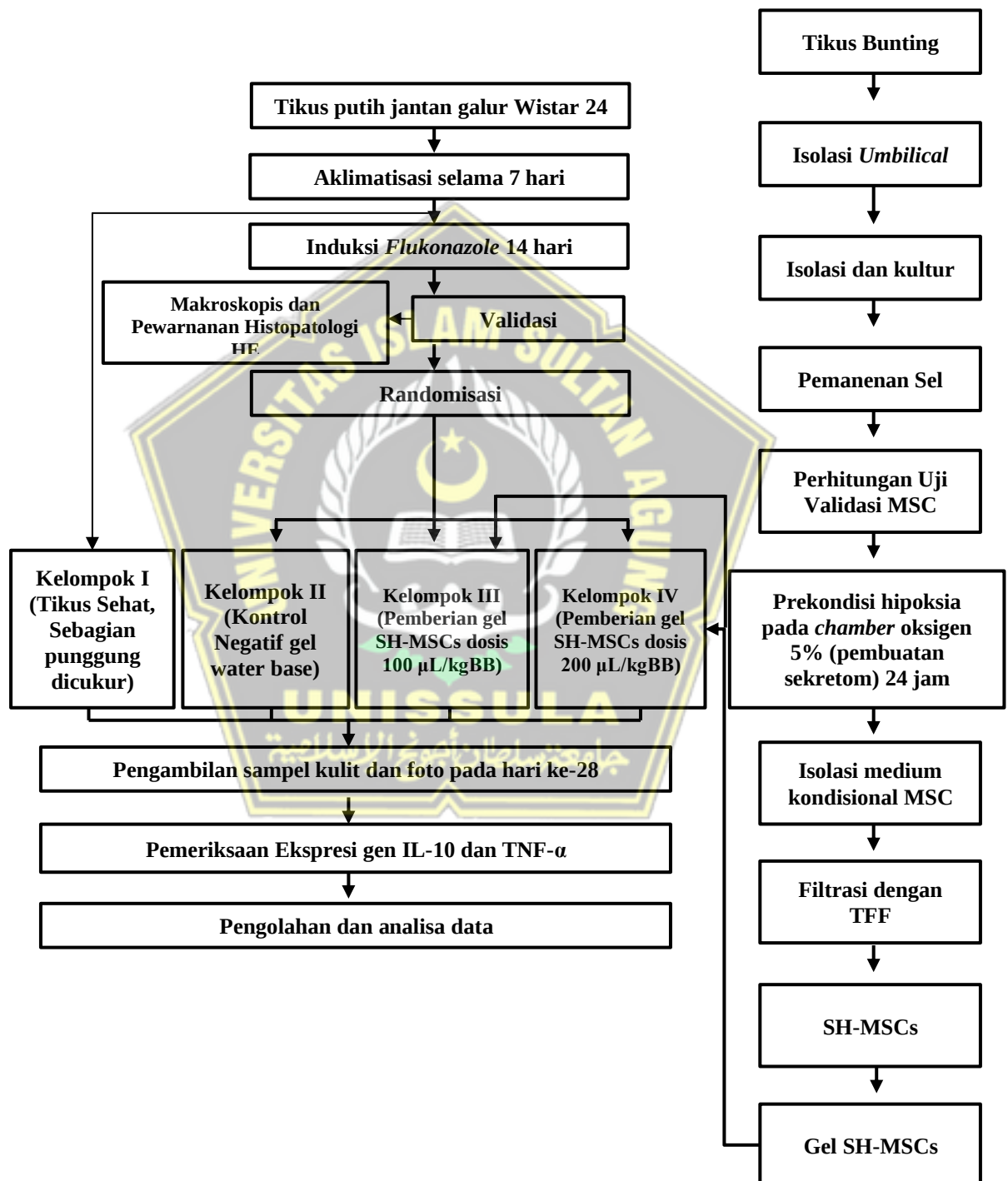
4.8.1 Tempat pelaksanaan

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) FK Unissula Semarang.

4.8.2 Waktu penelitian

Penelitian akan dimulai bulan Agustus-Oktober 2023, dimulai dengan persiapan peralatan, pemesanan reagensia, pemesanan serta persiapan hewan coba.

4.8.3 Alur penelitian



Bagan 4. 1 Alur penelitian

BAB V

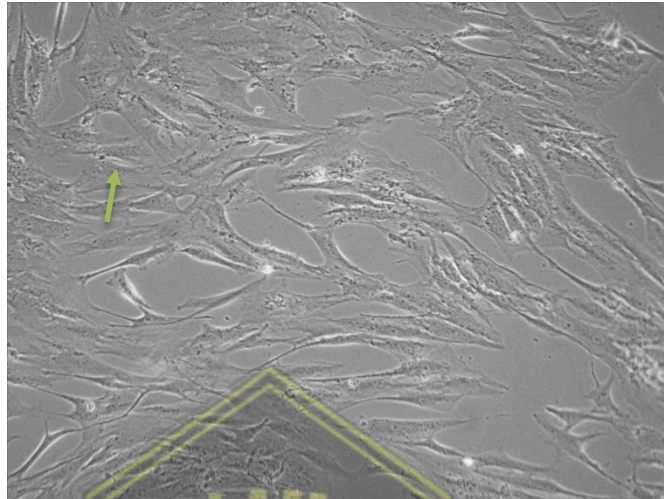
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh gel topikal SH-MSCs terhadap peningkatan ekspresi gen IL-10 dan penurunan ekspresi gen TNF- α pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole*. Subjek penelitian menggunakan 24 ekor *Wistar* yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu Kelompok P1 (Tikus sehat), kelompok kontrol negative P2 (Tikus model *alopecia like* dengan perlakuan base gel topikal), Kelompok P3 (Tikus model *alopecia like* dengan pemberian gel topikal SH-MSCs dosis 100 μ L/kgBB), dan kelompok P4 (Tikus model *alopecia like* dengan pemberian gel topikal SH-MSCs dosis 200 μ L/kgBB). Penelitian ini merupakan jenis eksperimental *in vivo* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*, dilakukan pada bulan Agustus-Oktober 2023 di Laboratorium SCCR.

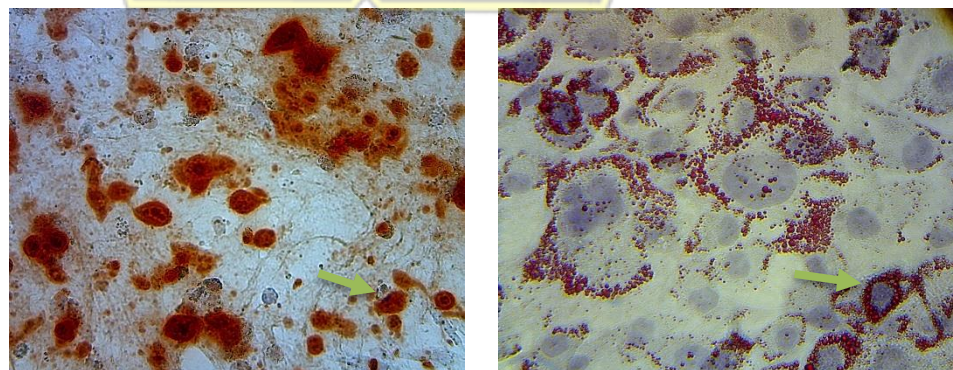
5.1.1 Isolasi SH-MSCs dari *Umbilical Cord*

Penggunaan tali pusar tikus *Wistar* yang hamil 19 hari, isolasi SH-MSCs ditambahkan media yang terdiri dari DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*), fungizone, penstrep, dan FBS, hasil isolasi kemudian dikultur dalam labu plastik. Ketika hasil kultur MSC diperiksa di bawah mikroskop, sel-sel dengan bentuk sel seperti gelendong yang menempel di dasar labu pada konfluensi 80%, seperti pada gambar 5.1.



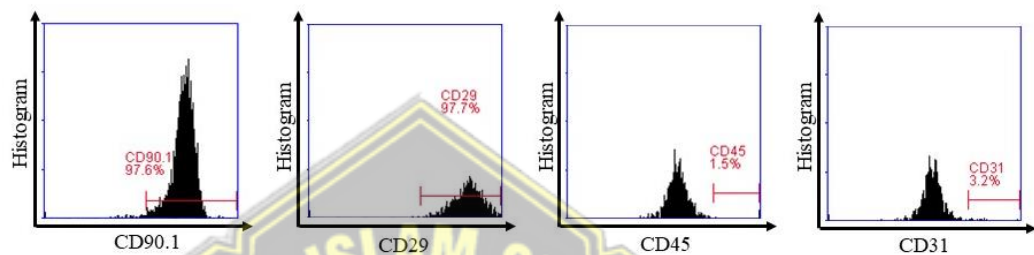
Gambar 5.1 hasil kultur MSC

Validasi hasil proses isolasi sel MSC dilakukan dengan melihat kemampuan MSC untuk berkembang menjadi sel osteogenik dan adipogenik. Dalam uji diferensiasi adipogenik, pewarnaan *oil red O* digunakan untuk menunjukkan terbentuknya lipid droplet berwarna merah. Terbentuknya endapan kalsium terlihat jelas pada warna merah dan ditunjukkan dengan uji diferensiasi osteogenik menggunakan pewarnaan *Alizarin red*.



Gambar 5.2 uji diferensiasi adipogenik, pewarnaan *oil red O* uji diferensiasi osteogenik menggunakan pewarnaan *Alizarin red*.

Temuan isolasi SH-MSCs menunjukkan kemampuan untuk mengekspresikan berbagai penanda permukaan khusus, yang dikonfirmasi oleh *flow cytometry*. MSC mengekspresikan CD45 (97,6%), CD31 (97,7%), CD90 (1,5%), dan CD29 (3,2%).



Gambar 5.3 Uji konfirmasi dengan *flow cytometry*.

Penelitian ini melakukan isolasi terhadap *growth factor* dan sitokin anti inflamasi yang terkandung dalam SH-MSCs untuk mendapatkan SH-MSCs murni menggunakan sekretom yang diisolasi dari MSC yang diisolasi dari MSC prekondisi hipoksia 5% menggunakan *Tangential flow filtrasi* (TFF), SH-MSCs mengandung sitokin anti-inflamasi dan *growth factor*, setelah proses filtrasi dilakukan analisa kandungan sitokin *growth factor* dan anti-inflamasi, pengukuran kandungan *growth factor* dalam SH-MSCs dilakukan menggunakan metode ELISA. Hasil Analisa SH-MSCs diketahui mengandung kadar PDGF sebesar 1093.51 ± 53.85 pg/mL, kadar VEGF sebesar 1015.43 ± 56.95 pg/mL, kadar bFGF sebesar 1167.31 ± 68.53 pg/mL, kadar IL-10 sebesar 675.31 ± 41.35 pg/mL, dan kadar TGF- β sebesar 459.71 ± 20.03 pg/mL.

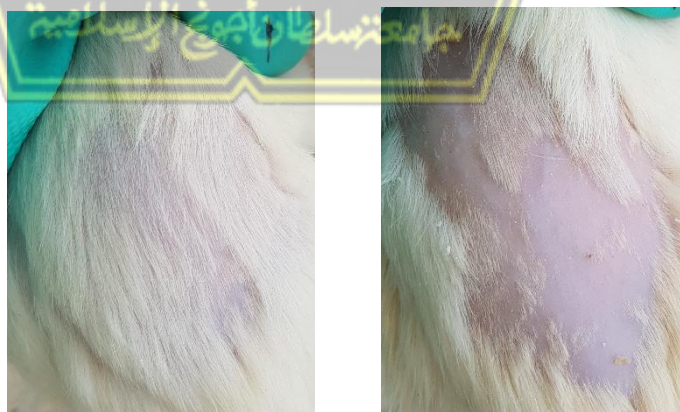
Tabel 5.1 Analisa kandungan sitokin *growth factor* dan anti-inflamasi, pada SH-MSCs.

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

5.1.2 Validasi Makroskopis dan Pewarnanan Histopatologi HE

5.1.2.1 Gambaran makroskopis kulit tikus *alopecia like*

Hasil pengamatan secara makroskopis pada kulit tikus *alopecia like* pada hari ke 14 setelah pemberian *fluconazole* menunjukkan perlambatan pertumbuhan bulu pada tikus jika dibandingkan dengan kelompok tikus sehat, seperti pada gambar 5.4:



Sehat H14

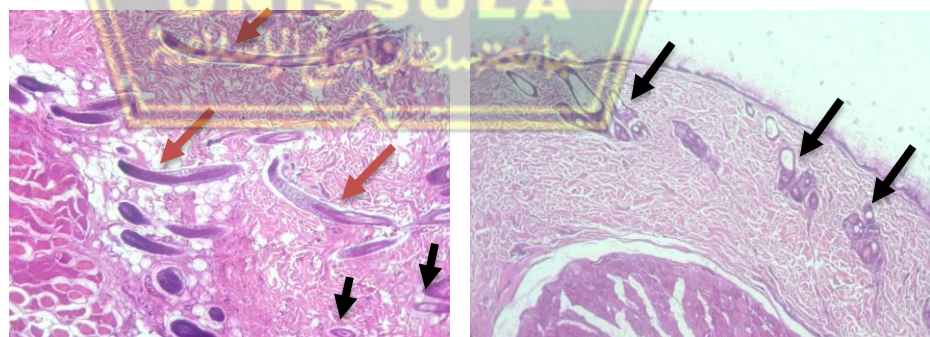
Fluconazole H14

Gambar 5. 4 Perbandingan pertumbuhan bulu tikus sehat dengan tikus yang diberikan *fluconazole*

Rata-rata persentase kebotakan hari ke 14 pada kelompok sehat didapatkan hasil $51,11 \pm 10,27$ sedangkan pada kelompok *alopecia like* didapatkan hasil rata-rata $68,26 \pm 7,96$, pengamatan secara makroskopis hasil prakondisi hewan coba tikus tervalidasi mengalami gangguan pertumbuhan bulu dengan pemberian *Flukonazole* 35 mg/kgBB,

5.1.2.2 Hasil pewarnaan HE jaringan kulit tikus *alopecia like*

Hasil pembacaan preparat histopatologi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE) menunjukkan bahwa kelompok tikus yang diinduksi dengan *Flukonazole* 35 mg selama 14 hari menyebabkan gangguan pada anagen follicle sehingga terjadi kerontokan, Preparat HE menunjukkan hasil tidak ditemukannya fase *anagen follicle* pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok tikus sehat yang berbeda secara mikroskopis memiliki fase *anagen follicle* pada lapangan pandang. Hasil analisis pewarnaan HE ditunjukkan pada gambar 5.5.



Gambar 5.5 Validasi folikel rambut tikus sehat dan *alopecia like* menggunakan HE. Panah hitam menunjukkan folikel fase telogen, panah merah menunjukkan folikel fase anagen

5.1.3 Ekspresi gen IL-10 dan TNF- α pada tikus model *alopecia like* dengan pemberian SH-MSCs.

Penelitian dengan metode RT-PCR menggunakan alat *Eco Real-Time PCR Illumina*, SH-MSCs menunjukkan hasil peningkatan kadar IL-10 pada tikus model *alopecia like*. dijelaskan pada tabel berikut:

Tabel 5.2 Ekspresi gen IL-10 dan TNF- α .

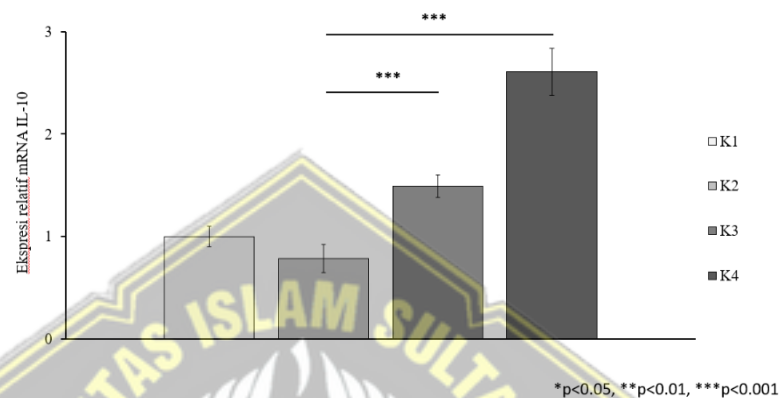
Variabel	Kelompok			pvalue
	P2/K2 n=6 Mean $\pm$ SD	P3/K3 n=6 Mean $\pm$ SD	P4/K4 n=6 Mean $\pm$ SD	
Ekspresi gen IL-10	0,79 $\pm$ 0,14	1,45 $\pm$ 0,11	2,61 $\pm$ 0,23	
<i>Saphiro wilk</i>	0,64	0,06	0,23	0,05
<i>Levene's Test</i>				0,00
<i>One way Anova</i>				
Ekspresi gen TNF- α	2,54 $\pm$ 2,0	1,40 $\pm$ 0,10	0,63 $\pm$ 0,20	
<i>Saphiro wilk</i>	0,26	0,47	0,38	0,77
<i>Levene's Test</i>				0,00
<i>One way Anova</i>				

Keterangan :

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

Berdasarkan tabel 5.2 rata-rata hasil ekspresi gen IL-10 pada kelompok kontrol negatif (P2) sebesar 0,79 $\pm$ 0,14, rata-rata kelompok gel SH-MSCs dosis 20 μ L (P3) sebesar 1,45 $\pm$ 0,11, dan nilai rata-rata pada kelompok gel SH-MSCs dosis 40 μ L (P4) sebesar 2,61 $\pm$ 0,23. Analisa statistik untuk normalitas dan homogenitas ekspresi gen IL-10 didapatkan hasil data terdistribusi normal dengan uji *Saphiro Wilk* ($p > 0,05$), dan homogenitas data didapatkan dari nilai uji *Levene's Test* 0,05 ($p > 0,05$).

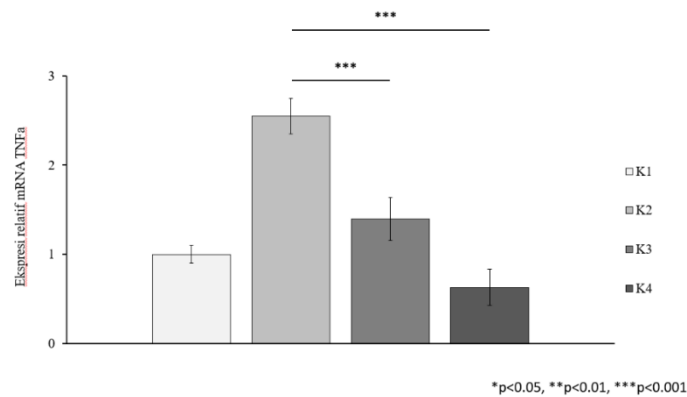
Dapat disimpulkan hasil data ekspresi gen IL-10 terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji *One way Anova* dengan nilai 0,00 ($p < 0,05$) sehingga dapat diketahui perbedaan signifikan ekspresi gen IL-10 antar kelompok pada tikus dengan model alopesia like.



Gambar 5. 6 Grafik ekspresi gen IL-10 tiap kelompok

Berdasarkan tabel 5.2 rata-rata hasil ekspresi gen TNF- α pada kelompok kontrol negatif (P2) sebesar $2,54 \pm 2,0$, rata-rata kelompok gel SH-MSCs dosis 20 μL (P3) sebesar $1,40 \pm 0,10$, dan nilai rata-rata pada kelompok gel SH-MSCs dosis 40 μL (P4) sebesar $0,63 \pm 0,20$. Analisa statistik untuk normalitas dan homogenitas ekspresi gen TNF- α didapatkan hasil data terdistribusi normal dengan uji *Saphiro Wilk* ($p > 0,05$), dan homogenitas data didapatkan dari nilai uji *Levene's Test* yaitu 0,77 ($p > 0,05$).

Dapat disimpulkan hasil data ekspresi gen TNF- α terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji *One way Anova* dengan nilai 0,00 ($p < 0,05$) sehingga dapat diketahui perbedaan signifikan ekspresi gen TNF- α antar kelompok pada tikus dengan model alopesia like.



Gambar 5.7 Grafik ekspresi gen TNF- α tiap kelompok

Berdasarkan grafik 5.6 rata-rata hasil ekspresi gen IL-10 nilai tertinggi pada kelompok SH-MSCs dosis 40 μ L (P4) dan mengalami penurunan Ekspresi gen TNF- α dengan nilai terendah pada kelompok SH-MSCs dosis 40 μ L (P4). Disimpulkan pada kelompok SH-MSCs dosis 40 μ L meningkatkan ekspresi gen IL-10 dan menurunkan ekspresi gen TNF- α pada tikus *Wistar* dengan model alopecia like yang diinduksi *flukonazole*.

5.1.3.1 Perbandingan Ekspresi gen IL-10 antar kelompok pada tikus model alopecia like dengan pemberian gel SH-MSCs.

Berdasarkan uji statistik, data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji statistik *One way Anova* yang dilanjutkan dengan uji parametrik *Post Hoc LSD* untuk mengetahui kelompok dosis gel topikal SH-MSCs yang paling berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen IL-10 tiap kelompok. Didapatkan hasil yang beda bermakna antar semua kelompok P2, P3, dan P4 dengan signifikansi $p:0,000$ ($P < 0.05$).

Tabel 5. 3 Perbandingan ekspresi gen IL-10 antar kelompok dengan uji *Post Hoc LSD*

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
P2	P3*	0,00	-0,90	-0,49
	P4*	0,00	-2,04	-1,62
P3	P2*	0,00	0,49	0,91
	P4*	0,00	-1,34	-0,92
P4	P2*	0,00	1,62	2,04
	P3*	0,00	0,92	1,33

Uji LSD: * *mean difference significant* P <0.05

5.1.3.1 Perbandingan Ekspresi genTNF- α antar kelompok pada tikus model alopecia like dengan pemberian SH-MSCs.

Berdasarkan uji statistik, data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji statistik *One way Anova* yang dilanjutkan dengan uji parametrik *Post Hoc LSD* untuk mengetahui kelompok dosis gel topikal SH-MSCs yang paling berpengaruh terhadap penurunan ekspresi gen TNF- α tiap kelompok. Didapatkan hasil yang beda bermakna antar semua kelompok P2, P3, dan P4 dengan signifikansi p:0,000 (P <0.05).

Tabel 5. 4 Perbandingan ekspresi gen TNF- α antar kelompok dengan uji *Post Hoc LSD*

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
P2	P3*	0,00	0,88	1,41
	P4*	0,00	1,65	2,17
P3	P2*	0,00	-1,41	-0,88
	P4*	0,00	0,50	1,03
P4	P2*	0,00	-2,18	-1,65
	P3*	0,00	-1,03	-0,50

Uji LSD: * *mean difference significant* P <0.05

5.2 Pembahasan

Alopesia merupakan kelainan dermatologis yang disebabkan infeksi bakteri atau jamur, inflamasi, maupun disregulasi imun.¹ Gangguan ditandai dengan fase anagen yang lebih pendek dan fase telogen yang lebih panjang dalam siklus rambut.¹ Keutuhan ujung rambut berhubungan dengan rambut kortikal, tekstur dan kilap rambut berhubungan dengan kualitas permukaannya.⁴⁵ Normalnya rambut akan terlepas dari kulit kepala hingga kurang lebih 100 helai setiap harinya, dianggap tidak normal bila lebih banyak rambut rontok dari 120 helai setiap hari, kerontokan rambut difus dan lokal keduanya mungkin terjadi rambut unifokal atau multifokal.⁴³

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan TNF- α pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole*. Model tikus alopesia yang diinduksi *flukonazol*, menggambarkan jenis kerontokan bulu pada fase telogen effluvium, Mekanisme molekuler perkembangan dari anagen menjadi katagen/telogen, dan pengendapan telogen effluvium, perubahan dalam metabolisme asam retinoat dan akumulasi asam retinoat sebagai kontributor utama penyebab perlu dianalisa lebih lanjut.²⁷

Penerapan sel punca ke jaringan yang direkayasa untuk menyusun kembali jaringan yang rusak dan mengembangkan terapi regeneratif untuk kulit.¹⁶ Perkembangan penelitian sel punca menggunakan MSC dalam memulihkan dan menyelamatkan jaringan iskemik melalui angiogenesis.⁷⁵ *Secretome* MSC menginduksi angiogenesis *in vitro* dan *in vivo*, faktor

angiogenik yang diekspresikan yaitu PDGF, BFGF, VEGF, TGF- β , *Angiopoietin-1* (ANG-1), *Placental Growth Factor* (PIGF), IL-6, dan MCP-1.⁷⁶ MSC berperan terhadap angiogenesis melalui diferensiasi langsung, interaksi kontak sel dengan jalur sel endotel, dan pelepasan molekul pro-angiogenik secara parakrin. Faktor parakrin dapat meningkatkan suplai darah dari jaringan yang rusak melalui aktivasi dan rekrutmen sel punca dan sel progenitor.⁷⁷

Hasil penelitian ekspresi gen IL-10 mengalami peningkatan tertinggi pada kelompok gel SH-MSCs dosis 200 μ L/kgBB (P4) sebesar $2,61 \pm 0,23$ dibandingkan dengan kelompok lainnya P2, dan P3, menunjukkan bahwa secara molekuler gel SH-MSCs signifikan meningkatkan ekspresi gen IL-10. MSC yang diinjeksi secara intravena dapat mencegah AA yang dicangkok pada kulit, kemungkinan melalui penghambatan produksi IFN γ , CXCL9, dan CXCL10 dan Infiltrasi sel T CD3 dan CD8+NKG2D+, menunjukkan bahwa penghambatan IFN γ yang dimediasi MSC dan infiltrasi sel T CD3 dan CD8+NKG2D+ melindungi terhadap keruntuhan folikel rambut.⁵⁷ Dengan mengsekresikan TGF β 1, IL10, dan PGE2, MSCs memiliki kapasitas untuk membuat sel iTreg dan memiliki kemampuan imunomodulator yang memodulasi lingkungan inflamasi.¹⁷ Sejalan dengan penelitian Byun *et al*, (2016) Peningkatan ekspresi sitokin Th1 proinflamasi, seperti IFN γ , dan CD8+NKG2D+ T sel, bertindak sebagai efektor sitotoksik, bertanggung jawab atas serangan autoimun pada HF dalam patogenesis AA. Ekspresi IFN γ meningkat secara abnormal pada lesi AA melalui respon yang dimediasi Th1.

Selain itu, IFN γ yang diproduksi dari sel T CD8 $^{+}$ menyebabkan kerontokan HF dan mempromosikan autoimunitas seluler tipe I. Imunosupresi yang dimediasi MSC memerlukan aktivasi awal sel kekebalan melalui sekresi sitokin proinflamasi, misalnya sebagai IFN γ . Penyakit inflamasi yang berhubungan dengan sitokin memiliki keuntungan dalam keberhasilan pengobatan dengan MSC.²⁷

Sel T patologis mengekspresikan IFN-C dan IL-17 di awal penyakit, dengan peningkatan signifikan produksi sitokin IL-4 dan IL-10.⁷³ Sitokin Th1 dan Th17 memicu serangan pada folikel rambut yang mengakibatkan penghentian prematur dari siklus pertumbuhan rambut dan induksi fenotipe alopesia dan selanjutnya menyebabkan terjadinya penyakit, sementara jalur Th2 mungkin berperan dalam penghambatan serangan imun yang dimediasi sel untuk menunda perkembangan penyakit.³⁵ Sel Treg berperan penting dalam menginduksi dan pemeliharaan toleransi terhadap self-antigen dan pencegahan autoimunitas, menghasilkan sitokin anti-inflamasi (TGF- β dan IL-10) dan mengatur fungsi sitokin pro-inflamasi.³⁶ IL-10 memiliki efek meregulasi dari pada efek stimulasi pada proses imunitas, menghambat produksi sitokin sel T yang diaktifkan. Peningkatan kadar IL-10 pada alopesia areata dibandingkan dengan kontrol sehat masih sulit dipahami karena reaksinya terpisah antara jalur Th2 dan Treg.³⁶

Hasil penelitian ekspresi gen TNF- α terendah pada kelompok gel SH-MSCs dosis 200 μ L/kgBB (P4) sebesar $0,63 \pm 0,20$ dibandingkan dengan kelompok lainnya P2, dan P3. menunjukkan bahwa gel SH-MSCs signifikan

menurunkan ekspresi gen TNF- α . Sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) mengoordinasikan pertumbuhan rambut siklis dalam patogenesis alopesia.^{2,3} Pasien AA memiliki kadar IL-6 dan TNF- α yang lebih tinggi, IL-6 menekan HFSC dalam keadaan diam melalui pensinyalan JAK/STAT (mengaktifkan HFSC untuk memperbaharui folikel rambut yang rusak). TNF- α memiliki peran penting dalam AA, penekanan kadar TNF- α secara efektif mengobati kasus *alopecia Universalis* (tahap AA yang parah) membuktikan bahwa penekanan kadar TNF- α efektif dalam pengobatan AA. Penurunan ekspresi IL-6 dan TNF- α dengan HF-MSC berpengaruh pada folikel rambut sehingga morfologi menjadi tetap utuh.¹⁵

Penelitian Deng *et al*, (2021). menunjukkan bahwa HF-MSC mempromosikan proliferasi folikel rambut dan mengurangi peradangan karena sel T CD8⁺ kurang diamati pada folikel Vibrissa yang diobati dengan HF-MSC. Terlebih lagi, pada model tikus C3H/HeJ, injeksi HF-MSC menekan AA dan menghambat sistem imun. Di sini kami menyediakan metode terapi potensial untuk pengobatan AA, yang menjanjikan dan bermanfaat bagi pasien AA.¹⁵ Faktor stimulasi dapat mengaktifkan sel T CD8⁺NKG2D⁺ dan menghasilkan IFN- γ melalui jalur JAK1 dan JAK3. IFN- γ dapat meningkatkan produksi IL-15 pada sel epitel folikuler melalui JAK1 dan JAK2. IL-15 kemudian berikatan dengan sel CD8⁺NKG2D⁺ T untuk menghasilkan lebih banyak IFN- γ , yang memperkuat loop umpan balik positif. IFN- γ mendorong keruntuhan hak istimewa kekebalan folikel rambut, yang mengarah pada pemaparan autoantigen ke sel CD8⁺NKG2D⁺ T dan

memfasilitasi serangan autoimun pada folikel rambut. Sementara itu, sel inflamasi lainnya, seperti DC, sel CD4⁺T, sel NK T, sel mast, dan eosinofil, akumulasi bermula di sekitar umbi rambut.⁷²

Pendekatan terapi sel punca menunjukkan keberhasilan, isolasi sel mononuklear yang diturunkan dari pasien dengan *alopecia areata*, sifat multipoten sel punca yang berasal dari darah tali pusat manusia dan kemudian mengembalikan dalam sirkulasi pasien. Dengan menggunakan pengobatan ini, pasien dengan *alopecia areata* parah mengalami perbaikan pada pertumbuhan rambut dan meningkatkan kualitas hidup. Mekanisme yang upregulasi sitokin T helper 2 (TH2) dan pemulihan keseimbangan TH1, TH2 dan TH3 produksi sitokin.⁶⁷ Efek samping dari banyak perawatan ini merupakan pertimbangan penting, ada kemungkinan bahwa kombinasi dengan dosis rendah dan/atau aplikasi topikal akan mencapai hasil dengan profil keamanan yang dapat diterima.⁶⁷

Kelemahan dari penelitian ini tidak menambah variasi dosis gel topikal SH-MSCs lebih besar dari dosis 20 µL dan dosis 40 µL, dan perlunya melakukan perbandingan ekspresi molekuler sitokin proinflamasi TNF-α, IL-1 dan IL-6 yang terkait inflamasi.

BAB VI

KESIMPULAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

6.1.1 Pemberian gel topikal SH-MSCs berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan ekspresi gen IL-10 pada dosis 40 μ L pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole*.

6.1.2 Pemberian gel topikal SH-MSCs berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi gen TNF- α pada dosis 40 μ L pada tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole*.

6.2 Saran

Saran untuk penelitian berikutnya antara lain:

6.2.1 Penelitian selanjutnya melakukan Analisa molekuler parameter IL-10 dengan melihat dosis lebih besar terhadap tikus *Wistar* dengan model *alopecia like* yang diinduksi *flukonazole*

6.2.2 Penelitian berikutnya perlu melihat perbandingan ekspresi molekuler sitokin proinflamasi TNF- α , IL-1 dan IL-6 terkait inflamasi yang terjadi pada kasus alopesia yang diinduksi *flukonazole*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Li Y, Wang G, Wang Q, Zhang Y, Cui L, Huang X. Exosomes Secreted from Adipose-Derived Stem Cells Are a Potential Treatment Agent for Immune-Mediated Alopecia. *J Immunol Res.* 2022;2022. doi:10.1155/2022/7471246
2. Dasanders Jbowen M. *Effects of Interleukins, Colony-Stimulating Factor and Tumour Necrosis Factor on Human Hair Follicle Growth in Vitro: A Possible Role for Interleukin-1 and Tumour Necrosis Factor- α in Alopecia Areata.* Vol 135.; 1996.
3. Ito T, Tokura Y. The role of cytokines and chemokines in the T-cell-mediated autoimmune process in alopecia areata. *Exp Dermatol.* 2014;23(11):787-791. doi:10.1111/exd.12489
4. Rossi A, Cantisani C, Melis L, Iorio A, Scali E, Calvieri S. *Minoxidil Use in Dermatology, Side Effects and Recent Patents.* Vol 6.; 2012.
5. 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). doi:10.1186/s12967-014-0260-8
6. Safavi KH, Muller SA, Suman VJ, Moshell AN, Melton LJ. Incidence of Alopecia Areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 Through 1989. *Mayo Clin Proc.* 1995;70(7):628-633. doi:10.4065/70.7.628
7. Siiakma VK, Ol C;, Dawn T, Kumar B. *PROFILE OF ALOPECIA AREATA IN NORTHERN INDIA.*
8. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, et al. Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Res.* 2021;10:228. doi:10.12688/f1000research.51191.1
9. Xue M, Zhang X, Chen J, et al. Mesenchymal Stem Cell-Secreted TGF- β 1 Restores Treg/Th17 Skewing Induced by Lipopolysaccharide and Hypoxia Challenge via miR-155 Suppression. *Stem Cells Int.* 2022;2022. doi:10.1155/2022/5522828

10. Lee YJ, Park SH, Park HR, Lee Y, Kang H, Kim JE. Mesenchymal stem cells antagonize ifn-induced proinflammatory changes and growth inhibition effects via wnt/ β -catenin and jak/stat pathway in human outer root sheath cells and hair follicles. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9). doi:10.3390/ijms22094581
11. Deng W, Zhang Y, Wang W, et al. Hair follicle-derived mesenchymal stem cells decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce inflammation around the hair follicle. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-021-02614-0
12. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-1783. doi:10.3889/oamjms.2018.404
13. Ho CH, Lan CW, Liao CY, Hung SC, Li HY, Sung YJ. Mesenchymal stem cells and their conditioned medium can enhance the repair of uterine defects in a rat model. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2018;81(3):268-276. doi:10.1016/j.jcma.2017.03.013
14. Kuntardjo N, Dharmana E, Chodidjah C, Nasihun TR, Putra A. TNF- α -Activated MSC-CM Topical Gel Effective in Increasing PDGF Level, Fibroblast Density, and Wound Healing Process Compared to Subcutaneous Injection Combination. *Majalah Kedokteran Bandung*. 2019;51(1):1-6. doi:10.15395/mkb.v51n1.1479
15. Deng W, Zhang Y, Wang W, et al. Hair follicle-derived mesenchymal stem cells decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce inflammation around the hair follicle. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-021-02614-0
16. Martinez-Lopez A, Montero-Vilchez T, Sierra-Sánchez Á, Molina-Leyva A, Arias-Santiago S. Advanced medical therapies in the management of non-scarring alopecia: Areata and androgenic alopecia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):1-28. doi:10.3390/ijms21218390
17. Darlan DM, Munir D, Putra A, Jusuf NK. MSCs-released TGF β 1

- generate CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ in T-reg cells of human SLE PBMC. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2021;120(1):602-608. doi:10.1016/j.jfma.2020.06.028
18. Zhao J, Hu L, Liu J, Gong N, Chen L. The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts in vitro. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/578479
 19. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4). doi:10.1371/journal.pone.0001886
 20. Roddy GW, Oh JY, Lee RH, et al. Action at a distance: Systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. *Stem Cells*. 2011;29(10):1572-1579. doi:10.1002/stem.708
 21. Jorgensen C. Mesenchymal stem cells immunosuppressive properties: Is it specific to bone marrow-derived cells? *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(2). doi:10.1186/scrt15
 22. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15(1):42-49. doi:10.1038/nm.1905
 23. Mei SHJ, Haitzma JJ, Dos Santos CC, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(8):1047-1057. doi:10.1164/rccm.201001-0010OC
 24. Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W. Transforming Growth Factor (TGF)- β 1-producing Regulatory T Cells Induce Smad-mediated Interleukin 10 Secretion That Facilitates Coordinated Immunoregulatory Activity and Amelioration of TGF-

- β 1-mediated Fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(8):1179-1188. doi:10.1084/jem.20030917
25. Ou KL, Kuo YW, Wu CY, et al. The potential of a hair follicle mesenchymal stem cell-conditioned medium for wound healing and hair follicle regeneration. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2020;10(8). doi:10.3390/APP10082646
 26. Bak DH, Choi MJ, Kim SR, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells engineered to overexpress growth factors accelerate outcomes in hair growth. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2018;22(5):555-566. doi:10.4196/kjpp.2018.22.5.555
 27. Thompson Iii GR, Krois CR, Affolter VK, et al. Examination of Fluconazole-Induced Alopecia in an Animal Model and Human Cohort. Published online 2019. doi:10.1128/AAC
 28. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. ORIGINAL PAPER. http://www.gsf.de/biodv/matinspector_help.html.
 29. Zdanov' A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. *Crystal Structure of Interleukin-10 Reveals the Functional Dimer with an Unexpected Topological Similarity to Interferon*.
 30. Lazear HM, Nice TJ, Diamond MS. Interferon- λ : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity*. 2015;43(1):15-28. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.001
 31. Dasanders Jbowen M. *Effects of Interleukins, Colony-Stimulating Factor and Tumour Necrosis Factor on Human Hair Follicle Growth in Vitro: A Possible Role for Interleukin-1 and Tumour Necrosis Factor- α in Alopecia Areata*. Vol 135.; 1996.
 32. Kubo M, Motomura Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Front Immunol*. 2012;3(AUG). doi:10.3389/fimmu.2012.00275
 33. Berg DJ, Zhang J, Lauricella DM, Moore SA. *IL-10 Is a Central*

- Regulator of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin Production* 1. Vol 166.; 2001.
<http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/166/4/2674/1141015/2674.pdf>
34. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann` TR, et al. *TWO TYPES OF MOUSE T HELPER CELL IV. Th2 Clones Secrete a Factor That Inhibits Cytokine Production by Th1 Clones.*; 2014.
 35. Tembhre MK, Sharma VK. T-helper and regulatory T-cell cytokines in the peripheral blood of patients with active alopecia areata. *British Journal of Dermatology.* 2013;169(3):543-548. doi:10.1111/bjd.12396
 36. Gautam RK, Singh Y, Gupta A, Arora P, Khurana A, Chitkara A. The profile of cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A, and IL-23) in active alopecia areata. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(1):234-240. doi:10.1111/jocd.12970
 37. AA universalis teraki 96.
 38. Chen G, Goeddel D V. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway. *Science* (1979). 2002;296(5573):1634-1635. doi:10.1126/science.1071924
 39. Giordano CN, Sinha AA. Cytokine pathways and interactions in alopecia areata. *European Journal of Dermatology.* 2013;23(3):308-318. doi:10.1684/ejd.2013.2042
 40. 34 AA.
 41. Strober BE, Siu K, Alexis AF, et al. Etanercept does not effectively treat moderate to severe alopecia areata: An open-label study. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52(6):1082-1084. doi:10.1016/j.jaad.2005.03.039
 42. Pelivani N, Hassan AS, Braathen LR, Hunger RE, Yawalkar N. Alopecia areata universalis elicited during treatment with adalimumab. *Dermatology.* 2008;216(4):320-323. doi:10.1159/000113945

43. Kristiningrum E. *CONTINUING PROFESSIONAL DEVELOPMENT Akreditasi PP IAI-2 SKP Suplemen Untuk Rambut Sehat*. Vol 45.; 2018.
44. Kiani MT, Higgins CA, Almquist BD. The Hair Follicle: An Underutilized Source of Cells and Materials for Regenerative Medicine. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(4):1193-1207. doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00072
45. Sinclair RD. Healthy hair: What is it? In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Vol 12. Nature Publishing Group; 2007:2-5. doi:10.1038/sj.jidsymp.5650046
46. Kesika P, Sivamaruthi BS, Thangaleela S, Bharathi M, Chaiyasut C. Role and Mechanisms of Phytochemicals in Hair Growth and Health. *Pharmaceuticals*. 2023;16(2). doi:10.3390/ph16020206
47. Gentile P. Hair Loss and Telogen Effluvium Related to COVID-19: The Potential Implication of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma as Regenerative Strategies. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16). doi:10.3390/ijms23169116
48. Stough D, Stenn K, Haber R, et al. Psychological effect, pathophysiology, and management of androgenetic alopecia in men. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Vol 80. Elsevier Ltd; 2005:1316-1322. doi:10.4065/80.10.1316
49. Punca S, Karakteristik :, Dan P, et al. *Tinjauan Pustaka*. Vol 22.; 2016.
50. 31 Alwi.
51. Strong AL, Neumeister MW, Levi B. Stem Cells and Tissue Engineering: Regeneration of the Skin and Its Contents. *Clin Plast Surg*. 2017;44(3):635-650. doi:10.1016/j.cps.2017.02.020
52. Yates CC, Rodrigues M, Nuschke A, et al. Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1). doi:10.1186/s13287-017-0644-9

53. 0019 miyagawa2018.
54. Liu W, Yu M, Xie D, et al. Melatonin-stimulated MSC-derived exosomes improve diabetic wound healing through regulating macrophage M1 and M2 polarization by targeting the PTEN/AKT pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1). doi:10.1186/s13287-020-01756-x
55. Gentile P, Garcovich S. Autologous activated platelet-rich plasma (AA-PRP) and non-activated (A-PRP) in hair growth: a retrospective, blinded, randomized evaluation in androgenetic alopecia. *Expert Opin Biol Ther.* 2020;20(3):327-337. doi:10.1080/14712598.2020.1724951
56. Owczarczyk-Saczonek A, Krajewska-Włodarczyk M, Kruszewska A, et al. Therapeutic potential of stem cells in follicle regeneration. *Stem Cells Int.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/1049641
57. Byun JW, Kim HJ, Na K, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells prevent alopecia areata development through the inhibition of NKG2D expression: A pilot study. *Exp Dermatol.* 2017;26(6):532-535. doi:10.1111/exd.13255
58. Gilhar A, Etzioni A, Paus R. *Alopecia Areata.*
59. McPhee CG, Duncan FJ, Silva KA, et al. Increased expression of Cxcr3 and its ligands, Cxcl9 and Cxcl10, during the development of alopecia areata in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology.* 2012;132(6):1736-1738. doi:10.1038/jid.2012.17
60. Kang JS, Zheng Z, Choi MJ, Lee SH, Kim DY, Cho SB. The effect of CD34+ cell-containing autologous platelet-rich plasma injection on pattern hair loss: A preliminary study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2014;28(1):72-79. doi:10.1111/jdv.12062
61. Ma X, Chen S, Jin W, Gao Y. Th1/Th2 PB balance and CD200 expression of patients with active severe alopecia areata. *Exp Ther Med.* 2017;13(6):2883-2887. doi:10.3892/etm.2017.4312

62. Yoshida R, Tanaka K, Amagai M, Ohyama M. Involvement of the bulge region with decreased expression of hair follicle stem cell markers in senile female cases of alopecia areata. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011;25(11):1346-1350. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03956.x
63. Leirões GJ, Attorresi AI, Balañá ME. Hair follicle stem cell differentiation is inhibited through cross-talk between Wnt/ β -catenin and androgen signalling in dermal papilla cells from patients with androgenetic alopecia. *British Journal of Dermatology*. 2012;166(5):1035-1042. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10856.x
64. Ren J, Liu Y, Yao Y, et al. Intranasal delivery of MSC-derived exosomes attenuates allergic asthma via expanding IL-10 producing lung interstitial macrophages in mice. *Int Immunopharmacol*. 2021;91. doi:10.1016/j.intimp.2020.107288
65. Enamandram M, Kimball AB. Psoriasis epidemiology: The interplay of genes and the environment. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(2):287-289. doi:10.1038/jid.2012.434
66. Zhang P, Kling RE, Ravuri SK, et al. A review of adipocyte lineage cells and dermal papilla cells in hair follicle regeneration. *J Tissue Eng*. 2014;5. doi:10.1177/2041731414556850
67. Pratt CH, King LE, Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. Alopecia areata. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3. doi:10.1038/nrdp.2017.11
68. Plikus M V., Chuong CM. Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents. In: *Journal of Investigative Dermatology*. Vol 128. Nature Publishing Group; 2008:1071-1080. doi:10.1038/sj.jid.5701180
69. Petukhova L, Duvic M, Hordinsky M, et al. Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. *Nature*. 2010;466(7302):113-117. doi:10.1038/nature09114
70. Duvic M, Christiano AM, Hordinsky MK, Norris DA, Price VH,

- Amos CI. The national alopecia areata registry-update. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research*. 2013;16(1). doi:10.1038/jidsymp.2013.20
71. Strazzulla LC, Wang EHC, Avila L, et al. Alopecia areata: Disease characteristics, clinical evaluation, and new perspectives on pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(1):1-12. doi:10.1016/j.jaad.2017.04.1141
 72. Zhou C, Li X, Wang C, Zhang J. Alopecia Areata: an Update on Etiopathogenesis, Diagnosis, and Management. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021;61(3):403-423. doi:10.1007/s12016-021-08883-0
 73. Ito T, Tokura Y. The role of cytokines and chemokines in the T-cell-mediated autoimmune process in alopecia areata. *Exp Dermatol*. 2014;23(11):787-791. doi:10.1111/exd.12489
 74. Federer WT. Experimental Design Theory And Application, Third Edition. *Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi Bombay Calcuta* . Published online 1977.
 75. Matluobi D, Araghi A, Maragheh BFA, et al. Carvacrol promotes angiogenic paracrine potential and endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells at low concentrations. *Microvasc Res*. 2018;115:20-27. doi:10.1016/j.mvr.2017.08.003
 76. Kehl D, Generali M, Mallone A, et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *NPJ Regen Med*. 2019;4(1). doi:10.1038/s41536-019-0070-y
 77. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, 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(3):305-310. doi:10.3889/oamjms.2019.049