

**PENGARUH PEMBERIAN GEL TOPIKAL
*SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM
CELLS (SH-MSCs)***

TERHADAP EKSPRESI GEN IL-6 DAN TGF- β

(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Jantan Galur Wistar Model

Alopecia-like yang diinduksi fluconazole)

TESIS

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister (S2)**



**Disusun Oleh :
Meri Aldila Rahmanita
MBK.22.19.01.0289**

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2023

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN GEL TOPIKAL *SECRETOMEHIPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (SH-MSCs)**

**TERHADAP EKSPRESI GEN IL-6 DAN TGF- β
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Wistar Jantan Model *Alopecia-Like*
yang diinduksi *Fluconazole*)**

Disusun oleh

MERI ALDILA RAHMANITA

(MBK.22.19.01.0289)

Yang dipertahankan di depan tim Penguji
November 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,

Pembimbing II,


Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050


Prof. Dr. dr. Dedy Hermansyah, Sp.B.Subsp.Onk(K)
NIK. 198107032009121003

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu
Biomedik Fakultas kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung

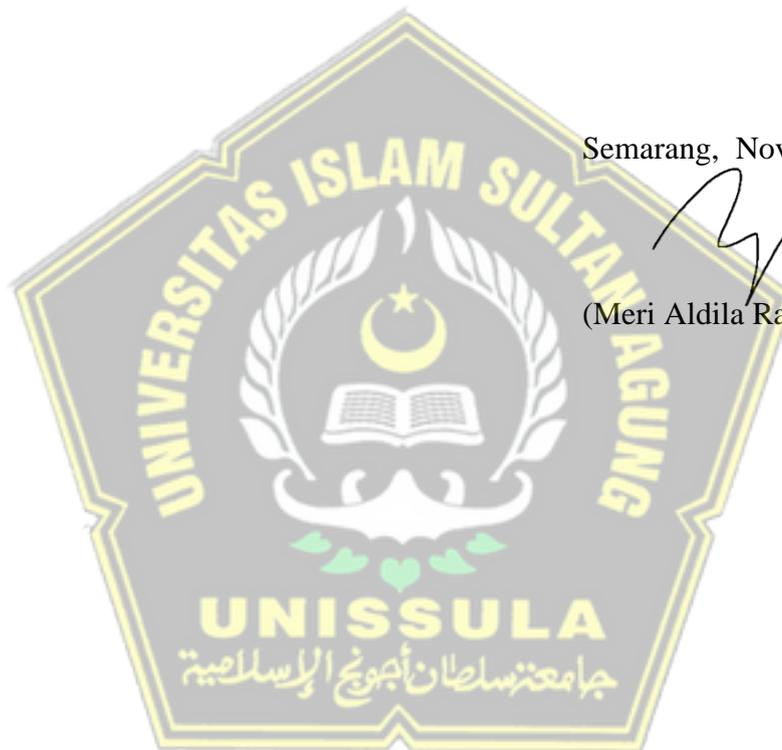

Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050

PERNYATAAN

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

Semarang, November 2023


(Meri Aldila Rahmanita)



KATA PENGANTAR

Puji syukur keadirat 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-6 dan TGF- β (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, SH, Sp.KF selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
3. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan sekaligus sebagai pembimbing I dalam penelitian yang telah berkenan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini.
4. Prof. Dr. dr. Dedy Hermansyah, Sp.B.Subsp.Onk(K) selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini.
5. Pada dosen pengajar dan rekan – rekan staf Magister Ilmu Biomedik yang tidak dapat disebutkan satu – satu yang telah memberikan doa dan dorongan kepada penyusun.
6. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
7. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan 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 tesis ini, tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Program Pendidikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik serta bagi pihak – pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua, amin

Semarang, November 2023



(Meri Aldila Rahmanita)



DAFTAR ISI

COVER.....	i
TESIS.....	ii
PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Originalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Interleukin-6 (IL-6)	11
2.1.1 Struktur Interleukin-6 (IL-6)	11
2.1.2 Peran Penting Interleukin-6 (IL-6)	11
2.1.3 Pengaruh Interleukin 6 (IL-6) terhadap rambut	12
2.2.2 Peran Penting TGF-β	13
2.2.3 Pengaruh TGF-β terhadap Rambut	14
2.3 Stem cell	15
2.3.1. Pengertian <i>Stem cell</i>	15
2.3.2. <i>Stem Cell</i> Mesenkimal	18
2.4 Rambut	23
2.4.1 Pengertian dan Fungsi Rambut	23

2.4.3	Siklus Rambut.....	24
2.5	Alopesia.....	25
2.5.1.	Pengertian Alopesia.....	25
2.5.2.	Penyebab Alopesia.....	25
2.5.3.	Jenis alopesia.....	27
2.5.4	Diagnosa Alopesia.....	27
2.5.6	<i>Alopecia-like</i> pada Tikus.....	28
2.6	<i>Fluconazole</i>.....	30
2.6.1	Definisi <i>Fluconazole</i>	30
2.6.2	Mekanisme Kerja.....	30
2.6.3	Farmakokinetik.....	30
2.6.4	Efek Samping.....	31
2.7	Pengaruh Gel <i>Secretome Hypoxia</i> MSC Terhadap Ekspresi gen IL-6 dan TGF-β pada Tikus Model <i>Alopesia-like</i>.....	31
2.8	Tikus Galur Wistar.....	33
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....		37
3.1.	Kerangka Teori.....	37
3.2.	Kerangka Konsep.....	39
3.3.	Hipotesis.....	40
BAB IV METODE PENELITIAN.....		41
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	41
4.2.	Populasi dan Sampel Penelitian.....	42
4.2.1.	Populasi.....	42
4.2.2.	Sampel Penelitian.....	42
4.2.3.	Teknik Pengambilan Sampel.....	43
4.2.4.	Besar Sampel.....	43

4.3. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian	44
4.3.2.2. Variabel Terikat	44
4.3.2.3. Variabel Terkontrol.....	44
4.4. Bahan	46
4.5. Alat	46
4.6. Cara Penelitian dan Alur Kerja	47
4.6.1. Cara penelitian	47
4.6.2. Alur Penelitian	55
4.7. Analisa Data	55
4.8. Jadwal dan Pelaksanaan penelitian	56
4.8.1. Tempat Penelitian	56
4.8.2. Waktu Penelitian.....	56
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	57
5.1. Hasil Penelitian	58
5.1.1. Validasi MSCs	58
5.1.2 Efek Pemberian SH-MSCs terhadap Ekspresi TGF- β dan ekspresi IL-6	
61	
5.2. Pembahasan	66
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	71
6.1. Kesimpulan	71
6.2. Saran	71
DAFTAR PUSTAKA	72
Lampiran 1.....	78
Lampiran 2.....	79

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	6
---	---



DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenokortikotropik Hormones</i>
ADSCs	: <i>Adipose Derived Stem Cells</i>
AT	: <i>Alopesia Totalis</i>
ATMP	: <i>Advances Therapy Medicinal Products</i>
AU	: <i>Alopesia Universalis</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
BMPs	: <i>Bone Morphogenic Proteins</i>
CM	: <i>Conditioned Media</i>
CRF	: <i>Corticotropin Releasing Factor</i>
CXCL9	: <i>Chemocine Ligand 9</i>
CXCL10	: <i>Chemocine Ligan10</i>
DEPC	: <i>Diethyl Pyrocarbonat</i>
DPCs	: <i>Dermal Papiler Cells</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FDA	: <i>Food Drug Administration</i>
FGF-7	: <i>Fibroblast Growth Factor-7</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
GMP	: <i>Good Manufacturing Practices</i>
HE	: <i>Hematosiklin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-γ</i>
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>

I κ B α	: <i>Enhancer in B-cells Inhibitor Alpha</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
MCP-3	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein-3</i>
MIP-1 α	: <i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i>
MMP-3	: <i>Matrix Metaloproteinase 3</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Pro-opiomelanocortin</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCCR	: <i>Stem Cell and Cancer Research</i>
SDF1	: <i>Stromal Cell-Derived Factor-1</i>
SH-MSCs	: <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
SPO	: <i>Sistem Penghantaran Obat</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
SOCS3	: <i>Supressor of Cytokine Signaling 3</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor- β</i>
Th1	: <i>T Helper 1</i>
Th2	: <i>T Helper 2</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
VEGF	: <i>Vascular Endhotelial Growth Factor</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur TGF- β	30
Gambar 2.2 Struktur Interleukin-.....	33
Gambar 3.1 Kerangka Teori	40
Gambar 3.2 Kerangka Konsep	41
Gambar 3.3 Skema rancangan penelitian.....	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Waktu Penelitian	66
---	----



ABSTRAK

Latar Belakang : Alopecia yang diinduksi oleh akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) akan menstimulasi perubahan pada sistem imun dan neuroendokrin. Folikel rambut memiliki *dermal papiler cells* (DPCs) yang berikatan dengan reseptor *corticotropin releasing Factor* (CRF). Penelitian menunjukkan bahwa *transforming growth factor* (TGF- β) merupakan salah satu ekspresi yang dapat menjadi indikasi pengaruh CRF. Efek dari CRF sendiri adalah mengakibatkan rambut rontok. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) terhadap ekspresi IL-6 dan ekspresi TGF- β .

Metode Penelitian : Penelitian ini menggunakan eksperimental in vivo dengan metode Post Test Only Control Group Design. Subyek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar yang dibagi menjadi 4 perlakuan yang terdiri dari 1 kelompok sehat, 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok perlakuan dengan SH-MSCs dosis 10% dalam dosis 200 mg/tikus/hari gel dan 1 lagi kelompok perlakuan dengan SH-MSCs dosis 20% dalam dosis 200 mg/tikus/hari. Pada hari ke-21 dilakukan pemeriksaan ekspresi IL-6 dan ekspresi TGF- β . Data di analisis menggunakan Uji *One Way Anova* dan Uji *Kruskall Wallis* untuk mengetahui pengaruh dari tiap kelompok.

Hasil : Uji *One Way Anova* menunjukkan hasil ekspresi IL-6 ($p= 0.000$) pada dosis 10% dan 20% terdapat perbedaan bermakna ($p<0.05$) pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Uji *One Way Anova* hasil ekspresi TGF- β ($p= 0.000$) pada dosis 10% terdapat perbedaan bermakna ($p<0.05$) pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Uji *Kruskall Wallis* hasil ekspresi TGF- β ($p=0.056$) pada dosis 20% tidak terdapat perbedaan bermakna ($p>0.05$) pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.

Kesimpulan : Pemberian dosis SH-MSCs 10% dan 20% dalam 200 mg gel dapat menurunkan ekspresi IL-6. Pemberian dosis SH-MSCs 20% meningkatkan ekspresi TGF- β pada tikus *Alopecia-like*. Pengembangan penggunaan SH-MSCs diharapkan dapat menjadi alternatif terapi alopecia yang lebih bermanfaat dan aman bagi tubuh.

Kata Kunci : *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs), *Ekspresi IL-6x*, *Ekspresi TGF- β*

ABSTRACT

Background: Alopecia induced by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) stimulates changes in the immune and neuroendocrine systems. Hair follicles have dermal papillary cells (DPCs) that bind to corticotropin releasing factor (CRF) receptors. Research shows that transforming growth factor (TGF- β) is one of the expressions that can be an indication of the influence of CRF. The effect of CRF itself is to cause hair loss. The purpose of this study was to determine the Secretome of Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) against IL-6 expression and TGF- β expression.

Research Method: This study used experimental in vivo with Post Test Only Control Group Design method. The subjects of this study were male rats of wistar strain which were divided into 4 treatments consisting of 1 healthy group, 1 negative control group, 1 treatment group with SH-MSCs dose 10% in a dose of 200 mg / rat / day gel and 1 more treatment group with SH-MSCs dose 20% in a dose of 200 mg / rat / day. On the 21st day, IL-6 expression and TGF- β expression were examined. Data were analyzed using the One Way Anova Test and the Kruskal Wallis Test to determine the effect of each group.

Goal : The One Way Anova test showed the results of IL-6 expression ($p = 0.000$) was a significant difference ($p < 0.05$) and the Kruskal Wallis test of TGF- β expression ($p = 0.000$) with SH-MSCs dose 200 was a significant difference ($p < 0.05$).

Conclusion: Administration of 10% and 20% doses of SH-MSCs in 200 mg gel may decrease IL-6 expression. Dosed SH-MSCs 20% increased TGF- β expression in alopecia-like rats. The development of the use of SH-MSCs is expected to be an alternative to alopecia therapy that is more beneficial and safe for the body.

Kata Kunci : *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs), Ekspresi IL-6x, Ekspresi TGF- β*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alopesia hilangnya sebagian atau seluruh rambut di bagian tubuh atau rambut¹. Pada alopesia terjadi perubahan beberapa *cytokine* pro-inflamasi yaitu *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan *interleukin-6* (IL-6), sehingga menyebabkan perubahan pada morfologi dan siklus pertumbuhan rambut yang berakibat pada kerontokan dan kebotakan². Alopesia yang diinduksi oleh akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) akan menstimulasi perubahan pada sistem imun dan neuroendokrin. Folikel rambut memiliki *dermal papiler cells* (DPCs) yang berikatan dengan reseptor *corticotropin releasing Factor* (CRF). Penelitian menunjukkan bahwa *transforming growth factor* (TGF- β) merupakan salah satu ekspresi yang dapat menjadi indikasi pengaruh CRF. Efek dari CRF sendiri adalah mengakibatkan rambut rontok¹. Peningkatan kadar TGF- β sebagai mediator anti inflamasi diharapkan dapat menurunkan CRF dan mengurangi tingkat kerontokan rambut.

Berbagai terapi dikembangkan untuk mengatasi alopesia, namun pengobatan konvensional yang di terima *Food Drug Administration* (FDA) hanya Minoxidil dan Finasterid. Pengobatan ini hanya memberikan hasil sementara serta memiliki banyak efek samping pada penggunaan jangka Panjang¹. Oleh karena itu, pendekatan terapi yang aman dan efektif diperlukan sebagai pelengkap terapi konvensional yang sudah ada. Salah satu terapi yang dikembangkan untuk

pengobatan alopecia yaitu menggunakan *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs)¹

Alopecia areata merupakan salah satu jenis alopecia yang prevalensinya diketahui menempati 2% dari keseluruhan populasi global di Dunia. Prevalensi tersebut meningkat dari 0,1% pada tahun 1970 menjadi 2,11% dalam beberapa tahun terakhir³. Di Negara USA, prevalensi alopecia areata menempati 0.57% sampai 3.8% dari jumlah populasi⁴. Prevalensi alopecia di USA bervariasi di setiap populasi dan studi yang berbeda⁵. Alopecia areata dapat berkembang menjadi bentuk yang lebih parah, yaitu alopecia totalis (AT) yaitu hilangnya semua rambut pada kulit kepala dan alopecia universalis (AU), dimana semua rambut di tubuh menjadi rontok⁵. Penderita alopecia terbanyak berada pada kelompok usia 30 hingga 59 tahun, yaitu kelompok usia yang pekerja. Berbagai penelitian tersebut menunjukkan dibutuhkan terapi yang lebih baik untuk mengatasi alopecia.

SH-MSCs adalah media kultur MSC yang disiapkan dalam kondisi hipoksia dan telah melalui proses filtrasi menggunakan teknologi *tangential flow filtration* (TFF)⁷. Studi preklinis menunjukkan SH-MSCs dapat meningkatkan pertumbuhan rambut melalui nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase⁸. Studi preklinis menunjukkan bahwa SH-MSCs mengandung berbagai sitokin anti-inflamasi, seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Insulin-like growth factor* (IGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *bone morphogenic proteins* (BMPs), interleukin-6 (IL-6), dan sitokin lainnya yang berhubungan erat dengan regenerasi rambut¹. SH-MSCs juga mengandung TGF- β yang merupakan sitokin anti inflamasi dan menghambat terjadinya kerontokan rambut^{1,7}. Studi preklinis lainnya

meneliti secara *in vitro* efek dari sekretom *Adipose Derived Stem Cells (ADSCs)* dalam model tikus Alopecia androgenik. Penelitian ini menemukan adanya efek imunomodulator⁹. Sekretom dari ADSCs menunjukkan adanya ekspresi *interferon- γ* (IFN- γ), *chemokine ligand 9 (CXCL9)*, dan *chemokine ligand 10 (CXCL10)* dan infiltrasi sel-T. Efek ASDCs terhadap alopecia juga dikonfirmasi dengan studi preklinis. Pada studi preklinis ini menunjukkan folikulogenesis dan pertumbuhan rambut yang dimediasi oleh sifat sekresi adiposit putih. Hasil penelitian ini membuka jalan bagi terapi regeneratif ADSCs untuk alopecia androgenik. Terdapat tiga puluh lima protein pensinyalan yang dianalisis, kadar VEGF, *epidermal growth factor (EGF)*, IL-6, Eotaxin, *monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3)*, IFN γ -*inducible protein-10* dan *macrophage inflammatory protein (MIP-1 α)* yang menunjukkan kadar lebih tinggi di zona kebotakan, sebaliknya, MCP-1 adalah yang terendah di zona kebotakan¹⁰. Studi klinis melaporkan terjadi peningkatan pensinyalan Wnt pada DPCs yang merupakan salah satu faktor utama yang meningkatkan pertumbuhan rambut. Sekretom dari MSC dan *platelet derived growth factor (PDGF)* mempengaruhi pertumbuhan rambut melalui proliferasi sel untuk memperpanjang fase anagen *fibroblast growth factor (FGF-7)*, menginduksi pertumbuhan sel (aktivasi *extracellular signal-regulated kinase (ERK)*), menstimulasi perkembangan folikel rambut (β -catenin), dan menekan isyarat apoptosis (Rilis Bcl-2 dan aktivasi Akt)¹⁶.

Interleukin-6 merupakan sitokin yang berperan dalam sistem imun non spesifik maupun sistem imun spesifik¹¹. Studi klinis menemukan bahwa IL-6 berperan pada patogenesis salah satu jenis alopecia yaitu alopecia areata melalui

regulasi jalur sel *T helper 1* (Th1) dan *T helper 2* (Th2). IL-6 yang diinduksi Th2 akan membuat kolapsnya akar rambut saat fase anagen melalui penghambatan sistem imun dan regulasi sel T yang tidak memadai. Studi klinik tersebut menemukan bahwa gangguan dari jalur persinyalan IL-6 dapat membuat rambut tumbuh kembali¹³.

TGF- β adalah suatu polipeptida pengatur fungsional yang secara independen mengontrol banyak aspek fungsi sel, diferensiasi, proliferasi, migrasi, apoptosis, adhesi, angiogenesis, dan kelangsungan hidup. TGF- β , sebagai sitokin pleiotropik, telah terbukti berperan dalam mengendalikan diferensiasi sel induk melewati *crosstalk* yang melibatkan jalur *Smad* dan *non-Smad*¹². TGF- β juga merupakan mediator anti inflamasi yang diharapkan dapat mengurangi kerontokan rambut.

Penelitian yang lalu melaporkan bahwa SH-MSCs dapat menekan sekresi sitokin proinflamasi. Pemberian SH-MSCs menghambat respon inflamasi dengan menurunkan kadar sitokin proinflamasi IL-6, IL-1 β , TNF- α , dan meningkatkan sitokin anti inflamasi IL-10 dan TGF- β sehingga dapat memperbaiki gejala alopecia¹. Namun sampai saat ini, belum pernah dilakukan penelitian tentang pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi IL 6 dan TGF- β pada tikus model *Alopecia-like*. Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian gel berbasis SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-6 dan TGF- β pada tikus galur wistar model alopecia-like.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah: Apakah terdapat pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-6 dan TGF- β pada tikus Wistar model *alopecia-like*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi IL-6 & TGF- β pada tikus wistar dengan model *alopecia-like*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari gel (10%) terhadap penurunan ekspresi gen IL-6 antar kelompok perlakuan yang dicukur dan di induksi *fluconazole* dibanding kontrol.
2. Membuktikan pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari gel (10%) terhadap peningkatan ekspresi gen TGF- β antar kelompok perlakuan yang dicukur dan di induksi *fluconazole* dibanding kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Nama/Tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Andjelkov K, Ilya E, Alexandra K ¹⁰	<i>Different levels of EGF, VEGF, IL-6, MCP-1, MCP-3, IP-10, Eotaxin and MIP-1α in the adipose-derived stem cell secretome in androgenetic alopecia.</i>	Studi klinis	Di antara tiga puluh lima protein pensinyalan yang dianalisis, kadar VEGF, EGF, IL-6, Eotaxin, MCP-3, IFN γ -inducible protein-10 dan MIP-1 α lebih tinggi di zona kebotakan dibandingkan dengan zona periumbilikal. Sebaliknya, MCP-1 adalah yang terendah di zona kebotakan dibandingkan dengan zona lainnya
2	Kim JE, Jee HO, Young JW, Ji HJ, Hoon K ⁹	<i>Effects of mesenchymal stem cell therapy on alopecia areata in cellular and hair follicle organ culture models</i>	Studi preklinis	Penelitian ini mengindikasikan pengaruh <i>stem cell</i> mesenkimal pada alopecia dan IFN- γ . Pengaruh ini di indikasikan melalui jalur ekspresi Wnt/ β -catenin and JAK/STAT serta berbagai faktor pertumbuhan .
3	Lee YI, Jihee K, Kim JK, Sujin P, Ju HL ¹⁵	<i>The Effect of Conditioned Media From Human Adipocyte-Derived Mesenchymal Stem Cells on Androgenetic Alopecia After Nonablative Fractional Laser Treatment</i>	Studi klinis	Perbandingan kepadatan rambut selama masa pengobatan menunjukkan bahwa kelompok ADSC-CM memiliki kepadatan akhir yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok plasebo. GIS dari kelompok ADSC-CM juga secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok plasebo. Akhirnya, tidak ada efek

				samping yang terkait dengan penerapan ADSC-CM selama penelitian.
4	Gentile P, Maria G Scioli, Alessandra B, Barbara DA, Ciro DS, Domenico DF, Gabriele C , Angelo T, Augusto O, Valerio C, Simone G ¹⁶	<i>Platelet-Rich Plasma and Micrografts Enriched with Autologous Human Follicle Mesenchymal Stem Cells Improve Hair Re-Growth in Androgenetic Alopecia.</i>	Studi klinis	23 minggu setelah perawatan terakhir dengan peningkatan ketebalan rambut rata-rata ($29 \pm 5,0\%$) di atas nilai awal untuk area yang ditargetkan. 12 minggu setelah injeksi terakhir dengan A-PRP rata-rata jumlah rambut dan kepadatan rambut ($31 \pm 2\%$) meningkat secara signifikan di atas nilai awal. Peningkatan pensinyalan Wnt pada Sel Dermal Papilla ternyata merupakan salah satu faktor utama yang meningkatkan pertumbuhan rambut. Pensinyalan dari sel punca mesenkimal dan faktor pertumbuhan turunan trombosit secara positif memengaruhi pertumbuhan rambut melalui proliferasi sel untuk memperpanjang fase anagen (FGF-7), menginduksi pertumbuhan sel (aktivasi ERK), menstimulasi perkembangan folikel rambut (β -catenin), dan menekan isyarat apoptosis (Rilis Bcl-2 dan aktivasi Akt).
5	Bak DHB, Mi JC, Soon RK, Byung CL, Jae MKi, Eun SJ, WO, Ee SL, Byung CP, Moo JK,	<i>Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (HuCB-MSC) engineered</i>	Studi preklinis.	Secara keseluruhan, data ini menunjukkan bahwa hUCB-MSC meningkatkan pertumbuhan rambut

	Jungtae N, Beom JK ¹⁷	<i>to overexpress growth factors accelerate outcomes in hair growth.</i>		melalui mekanisme parakrin.
6	Deng W, Yuying Z, Wei W, Aishi S, Omar M, Jiarong H, Xiaobo H, Sihao D, Zuoxian L, Jean DH, Rongqi H, Kexin P, Bing N, Shusheng Z, Xiaoxin Y, Ji L. Lin PW, Zhiyuan L ²	<i>Hair follicle-derived mesenchymal stem cells (HF-MSCs) decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce inflammation around the hair follicle</i>	Studi preklinis	Penelitian ini memberikan pendekatan terapi baru untuk alopecia areata berdasarkan HF-MSCs terhadapnya aplikasi klinis masa depan

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian sekretom dari *Adipose Derivate Stem Cells* (ADSCs) dapat menurunkan ekspresi dari IL-6 sehingga menurunkan zona kebotakan pada rambut manusia. Perbedaannya pada penelitian terdahulu, sekretom yang digunakan adalah ADSCs dan menganalisis VEGF, EGF, IL-6, Eotaxin, MCP-3, IFN γ -inducible protein-10 dan MIP-1 α . Pada penelitian ini gel sekretom yang digunakan berasal dari MSCs yang dioles topikal pada tikus yang diinduksi *fluconazole* dan menganalisis ekspresi gen IL-6 dan TGF- β ¹⁰. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian MSCs memberikan pengaruh pertumbuhan rambut pada alopecia areata dengan melihat ekspresi dari IFN- γ ⁸. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini, dimana gel SH-MSCs di oles topikal pada tikus alopecia yang diinduksi *fluconazole* dan dianalisis kadar ekspresi IL-6 dan TGF- β ⁹. Penelitian terdahulu melaporkan terdapat pengaruh sekretom *Adipose Deived Stem Cells* terhadap kepadatan dan pertumbuhan rambut pada alopecia androgenik, Perbedaannya pada peneltian terdahulu menggunakan sekretom

ADSCs yang dikombinasikan dengan laser *fractional* dan merupakan studi klinis yang langsung diuji pada manusia untuk melihat perubahan morfologi rambut, sedangkan penelitian ini menggunakan gel SH-MSCs yang dioles topikal pada tikus yang diinduksi *fluconazole* dan menganalisis ekspresi gen IL-6 dan TGF- β ¹⁵. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa MSC meningkatkan kepadatan dan pertumbuhan rambut pada alopecia androgenik, perbedaannya pada penelitian terdahulu menggunakan HF-MSCs yang berasal dari *micrograft* yang kaya akan stem cell dan PRP, dan merupakan studi klinis dengan cara injeksi langsung pada kulit kepala manusia, sedangkan pada penelitian ini menggunakan SH-MSCs yang dioles topikal pada tikus yang diinduksi *fluconazole* dan menganalisis ekspresi gen IL-6 dan TGF- β ¹⁶. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa sekretom dari HuSCs juga dapat meningkatkan kepadatan rambut melalui mekanisme parakrin dengan menganalisis ekspresi dari sitokin IGFBP-1 dan VEGF, perbedaannya pada penelitian terdahulu sekretom berasal dari HuSCs yang disuntikkan pada kulit sedangkan penelitian ini menggunakan sekretom SH-MSCs yang dioles topikal pada tikus yang diinduksi *fluconazole* dan menganalisis ekspresi gen IL-6 dan TGF- β ¹⁷. Penelitian terdahulu melaporkan pemberian HF-MSCs menurunkan tingkat kerontokan rambut pada alopecia areata-*like* model dengan menguji ekspresi dari sitokin IFN- γ , sedangkan pada penelitian ini menggunakan gel SH-MSCs yang dioles topikal pada tikus yang diinduksi *fluconazole* untuk menganalisis ekspresi gen IL-6 dan TGF- β ².

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Segi Pelayanan Kesehatan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan gel topikal SH-MSCs dalam memperbaiki alopecia.

1.5.2. Segi Pendidikan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-6 dan TGF- β pada perbaikan alopecia.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Interleukin-6 (IL-6)

2.1.1 Struktur Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 anggota keluarga interleukin dan terdiri dari rantai polipeptide cytokine dengan struktur heliks4- α dan memiliki berat molekul 21-28 kDa¹⁸. IL-6 dilepaskan oleh sel T dan makrofag yang teraktivasi selama respons akut setelah cedera atau trauma dan dapat menyebabkan peradangan atau infeksi¹⁹.



Gambar 2.1 Struktur Interleukin-6¹⁸

2.1.2 Peran Penting Interleukin-6 (IL-6)

Pematangan dan aktivasi neutrofil, pematangan makrofag, dan diferensiasi limfosit T sitotoksik dan sel pembunuh alami (NK) semuanya dipengaruhi oleh IL-6, suatu sitokin pro-inflamasi. Pada trauma, infeksi, pembedahan, dan luka bakar, IL-6 adalah salah satu mediator paling awal dan paling signifikan yang menginduksi dan mengendalikan sintesis protein fase akut. Setelah cedera, fiksasi plasma IL-6 dapat dibedakan dalam waktu sekitar satu jam dengan fokus puncak berkisar antara 4 dan 6 jam, dan dapat berlanjut hingga 10 hari¹⁹.

Baik sistem imun spesifik maupun sistem imun non spesifik dipengaruhi oleh sitokin IL-6. Sel mononuklear, sel endotel vaskular, fibroblas, dan sejumlah sitokin lainnya, termasuk TNF- dan IL-1, menghasilkan sitokin ini. Sel T yang telah diaktivasi juga memproduksi sitokin ini. Reseptor IL-6 terdiri dari protein pembatas sitokin dan subunit transduksi tanda yang merupakan reseptor sitokin tipe I.¹⁹

2.1.3 Pengaruh Interleukin 6 (IL-6) terhadap rambut

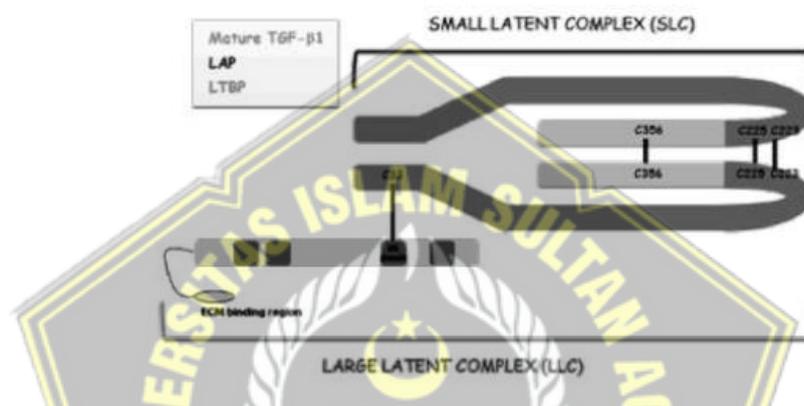
Studi klinis menemukan bahwa IL-6 berperan pada pathogenesis alopecia areata melalui jalur regulasi jalur sel Th1 dan Th2. IL-6 akan mempromosikan diferensiasi dari sel Th2 melalui Nukleus factor dari sel T yang aktif dan jalur IL-4 dependen. Hal ini secara langsung akan memblokir diferensiasi dari sel Th1 melalui pengaturan supresi dari sinyal sitokin. IL-6 yang diinduksi Th2 akan membuat akar rambut penderita alopecia areata kolaps melalui aktifitas imun inhibisi saat fase anagen dan regulator dari sel T yang tidak memadai¹¹.

2.2. Transforming Growth Factor β (TGF- β)

2.2.1 Struktur TGF- β

Ada tiga isoform berbeda dari protein TGF- yang disekresikan: TGF-1, TGF-2, dan TGF-3. TGF- β 1, adalah individu pertama dari kelompok ini yang pekerjaannya penting. TGF- β adalah superfamili protein yang dikenal sebagai superfamili beta komponen pengubah, yang menggabungkan inhibin, aktivin, dan bahan kimia yang bermusuhan dengan mullerian. Ikatan disulfida intramolekul menyatukan TGF-, sitokin dimer dengan struktur ikatan sistein. TGF- β terdiri dari 390 asam amino (pra-mendukung TGF- β atau little dormant complex (SLC)),

dengan berat 25kDa. Pra-pro-TGF- adalah monomer yang terdiri dari tiga bagian: peptida sinyal (SP: asam amino 1 hingga 29) Asam amino Peptida Terkait Latensi (30-278) dan Peptida Dewasa (TGF- β matang: asam amino 279 hingga 390) (gambar 1)²⁰



Gambar 2.2. Struktur TGF- β ²⁰

2.2.2 Peran Penting TGF- β

TGF- β berperan penting dalam beberapa proses sel termasuk ekspansi, pemisahan, pergerakan, dan apoptosis yang diharapkan dapat menjaga homeostasis jaringan. Dalam keadaan normal, TGF- β berperan dalam memberikan dampak apoptosis. Diferensiasi dan regenerasi sel bergantung pada hal ini. Jika TGF- β berada pada tingkat yang tidak dapat disangkal, hal itu akan menyebabkan kematian sel dalam jumlah besar. TGF- β adalah faktor yang dipancarkan, dan bergantung pada tipe sel, artikulasi ligan, dan porsinya. TGF- β bersifat pleiotropik, dan dalam beberapa kasus berlawanan dengan dampak sel terkait ekspansi, pemisahan, relokasi, dan pelepasan sel ²².

TGF- β juga disebut superfamili pembatas (ligan), reseptor, protein pembatas yang bersama-sama berperan dalam menjaga kekuatan struktur vena. Selain itu, sintesis protein matriks ekstraseluler ginjal diatur secara signifikan oleh TGF- β . TGF- β I hingga III merupakan individu dari superfamili yang juga mengandung aktin, protein morfogenik tulang (BMPs), dan inhibin, TGF- β I merupakan pengiklat yang mengumpulkan ECM terbanyak. TGF- juga merupakan faktor pertumbuhan multifungsi yang memainkan peran penting dalam mempengaruhi perilaku sel dalam jaringan. Melalui berbagai proses fisiologis dan patologis, TGF- terlibat dalam pengaturan migrasi sel, proliferasi, dan sintesis protein. TGF- β juga bertindak sebagai kemoatraktan untuk berbagai jenis sel dan dapat menghasilkan beberapa faktor angiogenik seperti VEGF, PDGF, dan (TNF- α), yang mempercepat proses neovaskularisasi dalam keadaan hiperglikemia berkepanjangan.²³

2.2.3 Pengaruh TGF- β terhadap Rambut

Studi klinis menemukan bahwa TGF- β memiliki reseptor yang berikatan dengan CRF. Pada DPC folikel rambut terdapat reseptor yang dapat melepaskan CRF. CRF merupakan reseptor yang berkaitan dengan stress. Stres baik itu internal atau eksternal dapat mencetuskan terjadinya perubahan sistem imun dan neuroendokrin. Stres berkepanjangan dapat meningkatkan sitokin inflamasi (misalnya IL-6 dan INF- γ) sehingga menyebabkan inflamasi yang berakhir pada apoptosis, penuaan sel dan transisi katagen prematur. Ketika individu berada dalam kondisi stres, produksi CRF di hipotalamus meningkat. CRF akan berikatan dengan reseptor (CRFR1 dan CRFR2) pada DPC dan menginduksi cAMP tingkat tinggi,

serta protein kinase A tingkat tinggi. Hal ini akan mengakibatkan tingginya fosforilasi protein pengikat elemen respons cAMP (CREB). Secara berkesinambungan tingginya cAMP akan meningkatkan produksi *adrenokortikotropik hormones* (ACTH) yang berasal dari pro-hormon, *pro-opiomelanocortin* (POMC), oleh kelenjar hipofisis anterior. ACTH yang meningkat akan menaikkan produksi kortisol, yang merupakan efektor utama pada sumbu HPA, di korteks adrenal. Kenaikan kortisol akan mengurangi sintesis dan secara bersamaan mempercepat degradasi komponen struktural kulit (*hyaluronic* dan *proteoglikan*) sebesar 40%. Komponen struktural ini memainkan peran penting pada fungsi normal dan mekanisme siklus folikel rambut sehingga mengakibatkan terganggunya siklus pertumbuhan dan mengakibatkan kerontokan rambut²⁸.

CRF menghambat pemanjangan batang rambut dan proliferasi DPC melalui penghentian pembelahan pada fase G2/M. CRF juga menyebabkan akumulasi ROS dan menghentikan siklus sel. CRF menurunkan regulasi tingkat ekspresi sitokin terkait anagen seperti HGF, Wnt5a, TGF β , VEGF dan *versican*. Kerontokan rambut akibat stres berkontribusi terhadap umpan balik negatif sehingga meningkatkan angka insiden kerontokan rambut²⁸.

2.3 Stem cell

2.3.1. Pengertian Stem cell

Stem cell adalah sel yang dapat menciptakan sel-sel baru yang spesifik sesuai dengan organ dan jaringan tertentu. Mikroorganisme dasar adalah sel-sel yang tidak atau belum spesifik. Sel induk dibedakan berdasarkan kemampuannya

untuk berdiferensiasi menjadi sel lain dan kemampuannya untuk memperbaiki diri atau beregenerasi. Dalam perkembangan selanjutnya semua *stem cell* akan mengalami spesialisasi atau dibedakan dalam membentuk sel baru yang sesuai dengan turunan gen masing-masing individu²⁵

Stem cell memiliki kemampuan untuk membentuk sel-sel yang dapat berubah secara khusus dan mengambil tempat sel-sel yang mati atau hilang. Secara khusus, pembentukan kembali diri menggambarkan kemampuan mikroorganisme yang belum matang untuk menciptakan sel-sel kecil yang tidak dapat dibedakan dari induknya melalui pembelahan yang simetris atau berpotensi timpang. Kemampuan sel induk untuk menghasilkan berbagai sel anak yang berbeda ditunjukkan melalui diferensiasi. Pembentukan kembali sel terjadi melalui pembelahan yang merata dan kacau balau, sementara pemisahan menghasilkan sel-sel gadis kecil yang berbeda dan lebih jelas²⁶.

Proses pemisahan mikroorganisme dasar dipicu oleh sinyal dari dalam dan luar ponsel. DNA, yang mengkode cetak biru struktur dan fungsi sel baru, memengaruhi sinyal dari dalam. Sementara itu, tanda-tanda eksternal yang berperan dalam pemisahan sel antara lain senyawa kimia yang dikeluarkan oleh sel lain, kontak nyata dengan sel yang berdekatan, dan partikel tertentu dalam lingkungan mikro di sekitar mikroorganisme dasar. Kolaborasi sinyal pada siklus pemisahan membuat DNA mengalami perubahan epigenetik yang menyebabkan perubahan artikulasi DNA yang berujung pada pemisahan menjadi sel tertentu. Perubahan epigenetik ini dapat diperoleh melalui pembelahan sel²⁶.

Stem cell embrionik berasal dari blastokista dan *stem cell* dewasa ditemukan dalam jaringan dewasa. Pada *stem cell* embrio, sel-*stem cell* dapat berdiferensiasi menjadi semua jaringan embrio khusus. Perkembangan ilmu *stem cell* sering sekali dilakukan dengan tujuan sebagai sistem perbaikan organ tubuh dengan cara mengganti sel yang rusak. Menurut asalnya *stem cell* dapat diklasifikasikan ke dalam empat kelompok, yaitu: *stem cell* embrionik, *stem cell* fetal, *stem cell* ekstraembrional dan *stem cell* dewasa²⁷.

Berdasarkan sumbernya, ada dua macam *stem cell* yaitu:

- a. Sebelum ditanamkan ke dalam rahim, sel induk embrionik merupakan sel induk yang berasal dari embrio. Setelah pembuahan, embrio yang digunakan berumur 4-5 hari dalam fase blastokista. Sel induk embrio berpotensi majemuk, mampu memperbaharui diri, dan dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel apa pun yang ditemukan di dalam tubuh.
- b. *Stem cell* dewasa, Sel induk adalah sel induk yang tidak berdiferensiasi yang dapat ditemukan di seluruh tubuh. Mikroorganisme dasar dewasa pertama kali ditemukan di sumsum tulang, khususnya organisme hematopoietik yang tidak berdiferensiasi yang dapat menghasilkan semua trombosit merah, trombosit putih, dan trombosit. Sel-sel dewasa yang tidak berdiferensiasi dapat dipisahkan dari sumber jaringan yang berbeda, misalnya sumsum tulang, jaringan lemak, tali pusar Wharton Jam, tumbukan gigi dan lain-lain. Sel induk dewasa, seperti sel induk mesenkim, sel induk jaringan lemak, sel induk hematopoietik, dan sel induk endotel, pada dasarnya bersifat multipoten.²⁷.

2.3.2. *Stem Cell* Mesenkimal

2.3.3.1 Pengertian *Stem cell* Mesenkimal

International Society for Cellular Therapy mendefinisikan Sel induk mesenkimal adalah sel yang dapat memperbaharui diri dan melekat pada plastik dengan fenotip permukaan yang dapat berdiferensiasi menjadi jaringan lemak, tulang, dan tulang rawan, serta garis keturunan lainnya. Sel-sel ini dapat diperoleh dari berbagai sumber, misalnya trabekula tulang, jaringan lemak, sinovial, otot luar, kulit, darah, dan sumsum tulang. Mikroorganisme mesenkimal yang belum matang dapat berpisah menjadi jaringan yang menyusun lapisan mesoderm seperti osteoblas, kondrosit, dan adiposit, serta lapisan ektoderm dan endoderm. Kemampuan organisme mesenkimal yang tidak berdiferensiasi untuk memisahkan diri merupakan peluang potensial untuk melibatkan sel-sel ini sebagai sel restoratif dalam berbagai penyakit degeneratif.

Salah satu kualitas mendasar dari mikroorganisme dasar mesenkimal adalah bahwa mereka adalah sel-sel yang tidak berdiferensiasi yang paling efektif tersedia dan terbatas dari berbagai jaringan, seperti jaringan lemak, garis puser, ligamen, kornea, timus, limpa, otak besar, hati, cairan ketuban, plasenta, gigi. tumbuk. , terlebih lagi, sumber lain²⁹. Selain kemampuannya untuk memisahkan menjadi adiposit, osteoblas, dan kondroplas. Selain kardiomiosit, miosit rangka, sel endotel, tenosit dan hepatosit, sel saraf, sel fotoreseptor, penghasil insulin, sel saluran epidermal dan sebacea, serta sel epitel tubulus ginjal, sel punca mesenkimal juga dapat berdiferensiasi menjadi sel mesodermal, endodermal, dan ektodermal lainnya. turunan. Hal ini kemudian mendorong organisme mesenkimal yang tidak

berdiferensiasi sebagai pilihan yang paling banyak dipertimbangkan dan mungkin dapat dibuat sebagai Kerangka Penyampaian Obat (SPO) berbasis sel.³⁰

Stem cell mesenkimal harus memiliki 3 kriteria yaitu: (1) Dasar utamanya adalah sel dapat menempel pada bagian bawah wadah kultur plastik (murid plastik) pada media kultur standar. (2) Sel harus dapat mengekspresikan penanda CD105, CD73, dan CD90 tetapi tidak dapat mengekspresikan penanda CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 alpha, CD19, atau HLA-DR pada permukaan sel. 3) Aturan ketiga adalah mikroorganisme dasar mesenkimal dapat terpisah menjadi osteoblas, adiposit, dan kondroblas secara *in vitro*. untuk mengurangi sel pembakar, Ang1 untuk membangun kembali penetrasi epitel, jaringan metalloproteinase 3 (MMP3) dan MMP9 untuk mengintervensi neovaskularisasi, dan VEGF dan Epidermal Development Variable (EGF) untuk mempercepat reepitelisasi dengan memperluas ekspansi endotel.

Potensi Efek Samping *Stem cell* Mesenkimal Setelah Pemberian Secara In Vivo

Penggunaan *stem cell* mesenkimal memiliki aturan mengenai prosedur yang cukup ketat. Prosedur yang mengatur penggunaan *stem cell* mesenkimal diantaranya ditentukan *Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMP) serta pedoman dari *American Code of Federal Regulation of Food and Drug Administration* dan *European Medicines Agency*. Dalam pedoman ini memuat prosedur yang disebut sebagai "*Good Manufacturing Practices*" (GMP), terdiri dari banyak rekomendasi tentang prosedur kultur sel termasuk validasi dan kontrol kualitas untuk memastikan reproduksibilitas, efisiensi, dan keamanan produk medis

akhir yang optimal. Klasifikasi lain, yang ditentukan oleh pedoman *Food and Drug Administration* (FDA), mendefinisikan sel yang dikultur sebagai "*minimally*" dan "*more than minimally*" yang dimanipulasi yang menggambarkan prosedur "*that might alter the biological features of the cells.*"^{31,32}.

Kenyataannya menunjukkan bahwa banyak celah prosedur yang belum mendapatkan aturan dengan jelas. Sebagian besar protokol kultur sel yang telah dilaporkan sejauh ini tidak memadai, karena penggunaan media kultur sel tambahan, pengobatan enzimatis, dan ekspansi sel jangka panjang yang diketahui mengubah kualitas *stem cell* mesenkimal³³. Studi klinik menunjukkan aplikasi rekayasa bioproses untuk isolasi, ekspansi, validasi, dan produksi *stem cell* mesenkimal yang diturunkan dari sumsum tulang untuk penggunaan klinis. Peneliti menguji 48 *batch* sampel dari puncak iliaka untuk transplantasi autologous. Proses pembuatan terdiri dari berbagai langkah termasuk pengumpulan, isolasi, percobaan, dan semua kontrol kualitas yang diperlukan untuk konfirmasi fungsionalitas, keamanan, dan potensi MSC. Proses pembuatan terdiri dari berbagai langkah termasuk pengumpulan, isolasi, percobaan, dan semua kontrol kualitas yang diperlukan untuk konfirmasi fungsionalitas, keamanan, dan potensi *stem cell* mesenkimal. Kesimpulannya dari studi klinik menegaskan bahwa semua langkah efektif dan dapat direproduksi dan yang paling penting aman untuk penggunaan klinis³⁴. Namun demikian, validasi protokol isolasi dan kultur yang optimal sesuai dengan persyaratan "*Good Manufacturing Practices*" masih diperlukan.

2.3.3.3. *Hypoxia mesenchymal stem cells (SH-MSCs)*

Hipoksia atau hipoksia adalah suatu kondisi dimana terjadi kekurangan oksigen. Akibat penurunan respirasi oksidatif aerobik, hipoksia dapat merusak sel. Selain itu, hipoksia juga menyebabkan kerusakan dan kematian sel. Sel yang mengalami kerusakan akan membalasnya dengan melepaskan atom lain, termasuk faktor pertumbuhan tersirat trombosit (PDGF). Sel induk mesenkim dapat diaktifkan dan pembelahan dapat dikontrol oleh PDGF, suatu protein. Dampak langsung dari hipoksia 2% pada mikroorganisme mesenkim yang belum matang adalah perluasan ekspansi sel. Sementara itu, hipoksia 1,5% dapat meningkatkan apoptosis. Ekspresi VEGF, interleukin-6 (IL-6) dan IL-8 ditemukan cukup tinggi pada penelitian menggunakan sel induk hipoksia dari kultur MSC sumsum tulang dalam kondisi hipoksia 2%. Selain itu, hipoksia 5% juga menyebabkan penggandaan sel proses pneumonia manusia dengan memicu faktor mitogenik seperti PDGF, FGF-2, dan EGF. Meningkatkan efek parakrin VEGF dan angiogenesis di bawah hipoksia 5% adalah hal yang ideal. Proliferasi sel CM-SPM juga baik pada kondisi normoksik.^{35,36}

2.3.3.4 *Secretome MSCs*

Istilah *secretome stem cells* mengacu pada suatu larutan yang disekresikan oleh *stem cells*. *Secretome* digunakan untuk komunikasi antar sel meliputi protein, vesikel ekstraseluler, dan asam nukleat, dan molekul lain yang dilepaskan ke ruang ekstraseluler. *Secretome* berperan terhadap berbagai jenis protein serum, faktor pertumbuhan, faktor angiogenik, hormon, sitokin, protein matriks ekstraseluler, protease matriks ekstraseluler. Pada kadar yang rendah,

secretome berkontribusi dengan mediator lipid dan materi genetik yang dikodekan 10% dari genom manusia. Media yang bernutrisi dan mengandung molekul parakrin ini bersamaan dengan *stem cells* yang dikultur di dalamnya, disebut “*conditioned media*” (CM)”. *Stem cells* menghasilkan zat-zat ini melalui mekanisme konvensional dan non-konvensional, seperti translokasi protein, eksositosis, dan enkapsulasi vesikel atau eksosom.

MSCs adalah *stem cells* yang paling berperan untuk regenerasi dan perbaikan jaringan karena isolasinya yang cepat, ekspansi secara *in-vivo*. MSCs juga memiliki kemampuan yang dapat memperbaharui diri, membentuk koloni, membelah diri secara masif, memiliki pola ekspresi fenotipik, memiliki potensi diferensiasi secara *multilineage* melalui mekanisme parakrin. Setelah dikultur, *stem cells* mereka mengeluarkan sekretom dan yang terakhir ini dapat diambil dengan jarum suntik setelah sentrifugasi dan pembentukan supernatan. *Secretome* MSCs memiliki sifat imunomodulator, pro-angiogenik, pro-survival, anti-apoptosis, antioksidan, anti-fibrotik, dan anti-bakteri. Kendati begitu, ada beberapa masalah yang muncul ketika menangani *secretome* MSCs. Hal pertama yaitu sumber dari MSC sendiri. Isolasi dari jaringan yang berbeda (dewasa, prenatal dan embrionik) menunjukkan variasi dalam plastisitas, eksosom, mikrovesikel, mRNA, dan kemampuan transfer mitokondria. Perbedaan-perbedaan ini mempengaruhi hasil terapi SH-MSCs. Kedua, penuaan diketahui mengurangi kapasitas fungsional dan regeneratif SH-MSCs.

Pemberian SH-MSCs dianggap sebagai prosedur yang layak dan aman tanpa adanya laporan terjadinya efek samping. Sumber sel, asal donor, produksi

produk, dan status penyakit penerima merupakan faktor penting yang terkait dengan keamanan dan kemanjuran penggunaan SH-MSCs. Faktor tersebut adalah penggunaan protein sapi dalam media yang digunakan untuk membiakkan sel, observasi pembentukan jaringan tulang pada hewan coba, serta potensi terjadinya keganasan akibat respons imun. Seluruh faktor tersebut harus dievaluasi terlebih dahulu agar terapi sel baru ini dapat diterima dalam penerapan dan registrasi klinis yang luas

Dalam pengobatan regeneratif, terapi bebas sel memiliki keunggulan lebih dibandingkan terapi klasik berbasis *stem cells*. Dalam transplantasi *stem cells*, molekul yang disekresikan dapat membantu mencegah komplikasi imunologi, potensi metastasis, dan penyebaran infeksi. *Secretome* juga dapat diproduksi dalam jumlah besar dan siap digunakan lebih fleksibel. *Secretome* juga secara signifikan mengurangi biaya yang terkait dengan pembentukan dan pemeliharaan jalur sel sehingga memungkinkan untuk digunakan dalam situasi darurat seperti infark dan trauma²⁸.

2.4 Rambut

2.4.1 Pengertian dan Fungsi Rambut

Kulit dan kulit kepala menghasilkan sesuatu yang disebut rambut. Rambut tidak memiliki saraf yang berwujud, sehingga rambut tidak sakit saat dipangkas. Kecuali telapak tangan, telapak kaki, kuku, dan bibir, rambut merupakan salah satu adneksa kulit yang terdapat di seluruh tubuh.⁴⁰

Rambut memiliki berbagai fungsi yaitu, yang pertama sebagai pelindung kepala dari sinar matahari serta cuaca dingin. Fungsi yang kedua yaitu melindungi kulit terhadap pengaruh-pengaruh buruk misalnya alis mata melindungi mata agar keringat tidak mengalir ke mata, dan bulu hidung berfungsi menyaring udara. Fungsi ketiga yaitu sebagai pengatur suhu, mengontrol penguapan keringat, dan sebagai indera peraba⁴¹.

2.4.2 Jenis Rambut

Jenis rambut pada manusia pada garis besarnya dapat digolongkan 2 jenis:

- a. Rambut terminal, rambut kasar yang mengandung banyak pigmen. Terdapat di kepala, alis, bulu mata, ketiak, dan genitalia eksterna. Rambut terminal diproduksi oleh folikel-folikel rambut besar yang ada di lapisan subkutis. Secara umum diameter rambut $> 0,03$ mm.
- b. Rambut velus, rambut halus sedikit mengandung pigmen, terdapat 16 drene di seluruh tubuh. Rambut velus diproduksi oleh folikel-folike rambut yang sangat kecil yang ada di lapisan dermis, diameternya $< 0,03$ mm⁴².

2.4.3 Siklus Rambut

Siklus pertumbuhan folikel rambut akan terjadi terus menerus dan terbagi dalam 3 fase yaitu :

1. Fase Anagen : Sel-sel matriks melalui mitosis membentuk sel-sel baru, mendorong sel-sel yang lebih tua keatas. Aktivitas ini lamanya 2-6 tahun. Rambut dalam fase anagen berkisar 85%.
2. Fase Katagen : Fase peralihan yang didahului oleh penebalan jaringan ikat disekitar folikel rambut. Bagian tengah akar rambut menyempit, bagian

bawahnya melebar dan mengalami pertandukan sehingga berbentuk gada (*Club shaped*) yang relatif tidak berpigmen. Rambut dalam fase katagen berkisar 1%

3. Fase Telogen : Fase istirahat dimulai dengan memendeknya sel epitel dan berbentuk tunas kecil yang tunas kecil yang membuat rambut baru sehingga rambut gada (*club hair*) akan terdorong keluar. Rambut dalam fase telogen berkisar 10-15%⁴³.

2.5 Alopesia

2.5.1. Pengertian Alopesia

Alopesia adalah kerontokan rambut atau hilangnya rambut dari kulit yang pada keadaan normal memiliki rambut. Alopesia areata adalah kelainan yang ditandai oleh adanya bercak, kehilangan rambut yang biasanya terjadi pada kulit kepala maupun bagian lain dari tubuh⁴⁴. Alopesia selain merupakan masalah medis juga perlu dianggap serius karena memiliki sifat estetik. Alopesia bisa saja hanya mengenai lokasi tertentu dan berbatas jelas dan sangat umum terjadi

2.5.2. Penyebab Alopesia

Alopesia bisa terjadi karena berbagai penyebab, seperti kondisi kesehatan tertentu, penggunaan obat-obatan tertentu, perubahan hormon, faktor keturunan, perawatan rambut tertentu dan tentu saja proses penuaan. Kondisi medis yang dapat menyebabkan alopesia⁵⁵. Ada beberapa kondisi medis yang dapat menyebabkan alopesia, antara lain:

- a. Anemia (jumlah sel darah merah rendah)
- b. Anoreksia

- c. Gangguan autoimun, seperti lupus sistemik dan lupus diskoid
- d. Defisiensi zat besi kronis
- e. Penyakit atau infeksi
- f. Kurap
- g. Penyakit tiroid
- h. Trikotilomania (perilaku kompulsif, dimana orang mencabuti rambut mereka sendiri)
- i. Beberapa kelainan struktural rambut bawaan, seperti monilethrix (rambut pendek, rapuh, dan rusak yang muncul manik-manik) dan trichothiodystrophy (rambut pendek, kering dan jarang)⁴⁶.

Dalam identifikasi penyebab alopesia juga ditemukan bahwa obat-obatan yang dapat menyebabkan alopesia. Diketahui bahwa menggunakan satu atau beberapa jenis obat di bawah ini dapat menyebabkan alopesia. Diantara beberapa obat yang diidentifikasi dapat menyebabkan alopesia adalah:

- a. Anabolik steroid (efeknya mirip dengan hormon testosteron pada tubuh)
- b. Obat kemoterapi (anti kanker)
- c. Antidepresan
- d. Anti hipertensi (obat tekanan darah tinggi)
- e. Pil KB
- f. Pengencer darah
- g. Obat penyakit jantung
- h. Vitamin A dosis tinggi.

Kondisi lain yang dapat menyebabkan alopesia yaitu yang pertama terjadinya perubahan hormonal, seperti pada saat kehamilan, pasca melahirkan, dan selama menopause. Yang kedua yaitu, gangguan nutrisi dan stres emosional juga dapat mempengaruhi kerontokan rambut. Yang ketiga yaitu perawatan rambut seperti *extension*, pewarnaan rambut. Yang keempat, yaitu kebiasaan merawat dan menata gaya rambut yang salah atau berlebihan. Yang ke lima yaitu stres akibat peristiwa traumatik, seperti kematian, perceraian atau karena penyakit tertentu ⁴⁷ .

2.5.3. Jenis alopesia

Terdapat beberapa jenis yang dapat teridentifikasi :

a. Alopesia androgenik

Alopesia androgenik (juga dikenal sebagai androgenetic alopesia, alopesia androtesticleas, male pattern baldness, common baldness) merupakan sebuah bentuk umum kehilangan rambut pada laki-laki dan perempuan.

b. Alopesia Areata

Alopesia Areata adalah hilangnya rambut secara cepat dan baik Sebagian ataupun kompli. Berbentuk bercak satu atau lebih, berupa bulatan atau oval, biasanya dikepala dan tempat berambut lain.

c. Alopesia Prematur

Sering terjadi pada pria berumur dua puluhan dan disertai dermatitis seboroika yang berat ⁴⁸

2.5.4 Diagnosa Alopesia

Metode pemeriksaan pasien dengan keluhan alopesia ada beberapa macam :

1. Metode invasif (biopsi kulit kepala)

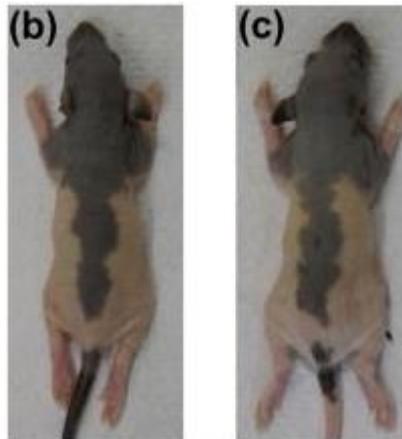
2. Semi invasif (trikogram),
3. Non invasif (perhitungan jumlah rambut, pemeriksaan mikroskopik, dermoskop).

Metode standar yang digunakan untuk mendiagnosis kelainan rambut dan kulit kepala seperti inspeksi klinis sederhana, pull test, dan biopsi.⁴⁸

Histopatologi merupakan alat diagnostik bagi dokter dalam mengevaluasi alopecia yang menunjukkan tingkatan dari proses inflamasi, (peribulbar/suprabulbar/isthmic/infundibular), derajat dari komponen seluler (ringan/sedang/berat), dan kualitas dan dominasi infiltrasi sel inflamasi (limfosit, sel plasma, neutrofil, eosinofil, sel mast). Selain itu, penilaian ada atau tidaknya kelenjar sebacea dan fibrosis perifolikular serta observasi anomali siklus rambut juga merupakan evaluasi rutin yang harus dilakukan.⁴⁹

2.5.6 Alopecia-like pada Tikus

Suatu studi preklinis menyebutkan bahwa kerontokan pada tikus yang diinduksi *cyclophosphamide* berawal dari area badan lalu ke arah posterior bagian leher⁵⁰. Pada studi preklinis lain menyebutkan bahwa kerontokan pada tikus yang diinduksi dengan hormone testosterone berawal dari area punggung atas dan pada akhirnya menyebar ke seluruh tubuh⁵¹.



Gambar 2.1 Perkembangan Kerontokan dan Kebotakan Pada Tikus yang diinduksi *cyclophosphamide*⁵⁰

Pada *alopecia-like* yang diinduksi *fluconazole* terdapat dugaan terjadinya alopesia-like akibat efek samping dari fluconazole. *Fluconazole* dan *Ketoconazole* merupakan golongan anti jamur azole yang di bekerja memicu reaksi sekunder dari interaksi P450. Pada *alopecia-like* yang diinduksi *fluconazole* muncul efek samping seperti kerontokan rambut dan toksisitas "like retinoid" (kulit kering, cheilitis dan lain sebagainya). Dugaan ini dikonfirmasi oleh hasil penelitian yang menyebutkan bahwa *fluconazole* sebagai penyebab khusus terjadinya *telogen effluvium*. *Fluconazole*, *vorikonazole*, *itrakonazole*, dan *ketokonazole* ditemukan menghambat hidroksilasi dari asam retinoat yang dimediasi CYP26A1 secara in vitro pada konsentrasi $>1 \mu\text{M}$ (15). Pada studi klinis tersebut juga menyebutkan tikus *alopecia-like* menunjukkan peningkatan 6 kali lipat kadar atRA plasma segera setelah menerima *fluconazole*. Hasil studi ini mendukung hipotesis yang diajukan sebelumnya tentang alopesia yang diinduksi *fluconazole* sebagai konsekuensi dari penghambatan metabolisme asam retinoat endogen. Hal tersebut juga memberikan

penjelasan secara ilmiah efek samping "*retinoid like*" yang juga muncul pada beberapa pasien yang menggunakan *fluconazole* atau *vorikonazole*.⁵²

2.6 *Fluconazole*

2.6.1 Definisi *Fluconazole*

Fluconazole merupakan suatu hidrofilik dari sintetik triazol, terdapat dalam bentuk oral dan parenteral *Fluconazole* termasuk antifungi golongan triazol yang ditemukan pada tahun 1982 dan pertama diperkenalkan di Eropa kemudian di Amerika Serikat. Bentuk sediaannya adalah kapsul 50 mg, 150 mg, dan injeksi 200 mg/100 ml

2.6.2 Mekanisme Kerja

Fluconazole bekerja menghambat sintesis *ergosterol* pada membran sel jamur dengan cara menghambat sistem enzim sitokrom P-450 14- α -*demethylase*. *Fluconazole* bersifat fungistatik. *Fluconazole* paling efektif terhadap jamur *Candida*, *Coccidioides immitis* dan *Cryptococcus neoformans*. *Fluconazole* efektif terhadap spesies *Candida*, tetapi memiliki sifat resistan terhadap *Candida krusei* dan *Candida glabrata*⁵³.

Penelitian menemukan bahwa *fluconazole* meningkatkan aktivitas enzimatis ROS dan GPx dan SOD pada sel yang diterapi. Aktivitas enzimatis tersebut tidak berbeda antara strain yang resisten dan rentan⁵⁴.

2.6.3 Farmakokinetik

Fluconazole secara cepat dan sempurna diserap melalui gastrointestinal. Bioavailabilitas oral flukonazol melebihi 90% pada orang dewasa. Konsentrasi

puncak plasma dicapai setelah 1 atau 2 jam pemberian oral dengan eliminasi waktu paruh plasma \pm 30 jam (20–50 jam) setelah pemberian oral. Absorbsinya tidak dipengaruhi oleh kadar asam lambung. Metabolisme *fluconazole* ini terjadi di hepar dan akan diekskresikan melalui urine. *Fluconazole* berifat hidrofilik sehingga sangat banyak ditemukan di dalam cairan tubuh juga terkandung dalam keringat dalam konsentrasi tinggi⁵³.

2.6.4 Efek Samping

Efek samping yang sering dijumpai adalah masalah gastrointestinal seperti mual, muntah, diare, sakit pada abdominal juga sakit kepala. Efek samping lain yaitu hipersensitivitas hepatotoksik, trombositopenia dan efek pada sistem saraf pusat⁵³.

2.7 Pengaruh Gel *Secretome Hypoxia* MSC Terhadap Ekspresi gen IL-6 dan TGF- β pada Tikus Model Alopecia-like

MSCs mensekresikan mediator-mediator dan *growth factor* yang disebut *secretome*. *Secretome* mengandung sitokin antiinflamasi (IL-10) dan *transforming growth factor* (TGF- β) yang berperan regenerasi sel dan proses pertumbuhan rambut^{1,58}. Kondisi hipoksia akan semakin memicu MSCs untuk mensekresikan molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator-mediator antiinflamasi dan *growth factor*⁵⁵. Selanjutnya disebut *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs).

Sitokin IL-10 yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan fosforilasi *Signal transducer and activator of transcription* (STAT3) dan membentuk homodimer yang bermigrasi ke nukleus untuk mendorong ekspresi gen yang responsif terhadap

STAT3, termasuk *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3). SOCS3 juga menghambat translokasi NF- κ B ke nukleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen pro-inflamasi. Melalui sintesis SOCS3 dan penghambatan *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), IL-10 dapat menekan ekspresi beberapa gen pro-inflamasi, termasuk gen sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ ⁵⁸.

Pada tikus model alopecia-like yang di induksi dengan *fluconazole* terjadi interaksi P450 dan peningkatan kadar ROS^{61,62}. ROS akan mengaktifkan jalur NF- κ B melalui fosforilasi salah satu protein yang membentuk kompleks IKK, yaitu *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha* (I κ B α). I κ B α kemudian akan mengalami degradasi dan disosiasi I κ B oleh *proteasome* dan mengarah ke ubiquitinasi. Transfer NF κ B ke gen target menginduksi aktivasi dan ekspresi berbagai molekul pro-inflamasi yang mempengaruhi overaktivasi sel imun seperti IL-6, IL-1 β , dan TNF- α . Salah satu sitokin yang bergantung pada NF- κ B yang paling diinduksi adalah IL-6, yaitu suatu glikoprotein pleiotropik yang disekresikan oleh berbagai jenis sel vaskular, termasuk makrofag, limfosit, fibroblas, sel endotel, dan sel otot polos⁵⁸.

Kandungan lain dari SH-MSCs adalah TGF- β . TGF- β dapat mengaktifasi fosforilasi SMAD2/3 untuk ditranslokasi ke nukleus dan menginduksi ekspresi sitokin anti-inflamasi^{57,61}. *Growth factor* (GF) dari sekresi *stem cells* akan mengaktifkan DPC untuk mengeluarkan protein seperti *stromal cell-derived factor 1* (SDF1), *Matrix metalloproteinase* (MMP3) dan *biglycan*. Protein tersebut akan berperan pada proses induksi pensinyalan Wnt. SDF1 dan *biglycan* kemudian akan mengaktifkan Wnt 3a. Jalur pensinyalan Wnt kanonik yang diinduksi akan berakhir

dengan tingginya ekspresi β -catenin. Yang terakhir TGF- β berperan sebagai pengatur utama pertumbuhan folikel rambut dan inisiator utama anagen fase. Pada saat yang sama MMP3 menghambat jalur pensinyalan Wnt non-kanonik dengan menonaktifkan Wnt-5b. Wnt-5b adalah faktor penghambat untuk pensinyalan β -catenin / Wnt. Faktor sekretori DPC lainnya termasuk LTBP1 juga secara kovalen berikatan dengan TGF- β dan mengaktifkan jalur pensinyalan TGF- β . Hal ini akan mengarah pada aktivasi pada jalur Smad 2/3 di HFSCs, sehingga menghindari regenerasi rambut yang lambat. LTBP1 juga berpartisipasi dalam penghambatan jalur pensinyalan BMP (BMP4) sehingga menghambat perkembangan folikel rambut dan mempertahankan folikel ini dalam fase telogen¹.

Beberapa patologi inflamasi kronis berhubungan dengan disregulasi fosforilasi/aktivasi kompleks NF- κ B: I κ B⁵⁹. Oleh karena itu, penghambatan fosforilasi menggunakan penghambat kinase merupakan strategi terapi yang menarik. Maka dengan adanya SH-MSCs, merupakan kandidat yang mampu mencegah terjadinya Alopesia rambut.

2.8 Tikus Galur Wistar

Hewan coba merupakan hewan yang dikembang biakkan untuk digunakan sebagai hewan uji coba. Tikus memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah, serta mudah untuk mendapatkannya, oleh karena itu tikus sering digunakan pada berbagai macam penelitian medis. Tikus merupakan hewan yang melakukan aktivitasnya pada malam hari (nocturnal)⁶⁰.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau biasa dikenal dengan nama lain Norway Rat berasal dari wilayah Cina dan menyebar ke Eropa bagian barat. Pada wilayah Asia Tenggara, tikus ini berkembang baik di Filipina, Indonesia, Laos, Malaysia, dan Singapura⁶¹. Tikus digolongkan ke dalam Ordo Rodentia (hewan pengerat), Famili Muridae dari kelompok mamalia (hewan menyusui). Tikus putih merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus memiliki beberapa galur yang merupakan hasil pembiakkan sesama jenis atau persilangan. Galur tikus yang sering digunakan untuk penelitian adalah galur Wistar.⁶²

Ciri-ciri galur Wistar adalah bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah, dan ekornya tidak pernah lebih panjang dari tubuhnya. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4 – 5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267 – 500 gram dan betina 225 – 325 gram.

Galur ini berasal dari Institut Wistar pada tahun 1906⁶³.

Studi klinis menyebutkan bahwa terdapat beberapa faktor perancu yang berperan saat melakukan penelitian pada mencit dan tikus yaitu :

1. Faktor yang berasal dari peternak

Meliputi latar belakang genetic dari tikus dan mencit, asal mencit dan tikus, status Kesehatan, kondisi lingkungan (besar kandang, jumlah tikus dalam satu kandang, lingkungan, pencahayaan, suhu, kelembapan, kondisi kebisingan, jumlah pakan dan minum, dan kebiasaan harian, rawatan kehamilan dan menyusui, besar kotak tempat buang air, dan aktifitas sosial (isolasi atau tidak)

2. Faktor yang berada di Laboratorium

Meliputi Besar sampel, randomisasi, variasi Inter-experimenter , detail dari paradigma test, habituasi, lingkungan tempat perlakuan, waktu tempat perlakuan, jenis kelamisan, usia saat perlakuan, kondisi di laboratorium, durasi proses aklimatisasi^{64,65}.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

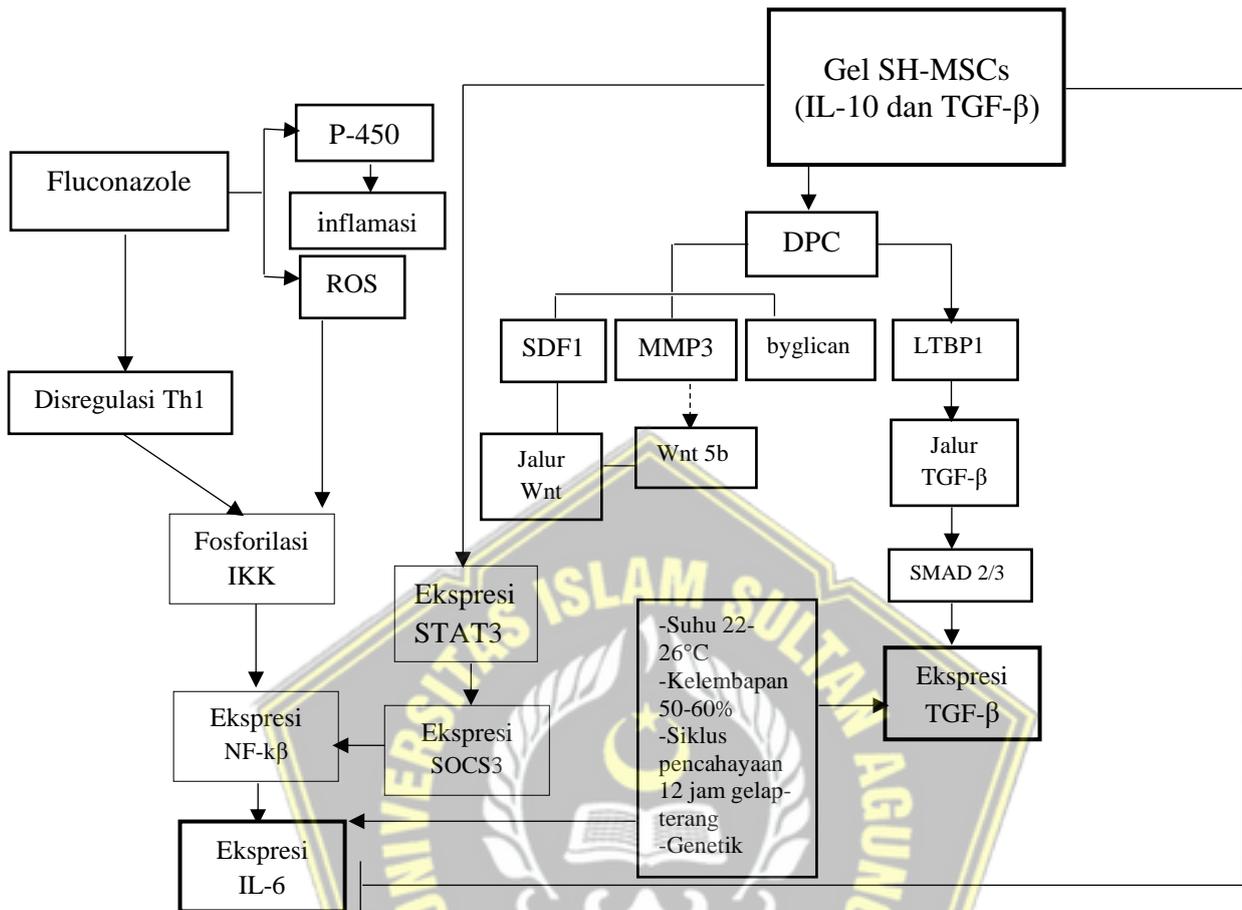
3.1. Kerangka Teori

Pada Alopecia terjadi perubahan beberapa sitokin pro inflamasi seperti IL-6 dan TGF- β sehingga menyebabkan perubahan pada morfologi dan siklus pertumbuhan rambut². Tikus yang diinduksi *fluconazole* akan terjadi gangguan pada sitokrom P-450 yang mengakibatkan kenaikan kadar ROS sehingga menyebabkan alopecia *like*⁵⁵. Penderita alopecia mengalami disregulasi kadar T serum dalam serum secara signifikan menyebabkan terganggunya sistem imun. Demikian pula seperti yang diamati pada *alopecia-like* disebabkan oleh terganggunya keseimbangan antara produksi ROS dan aktivitas antioksidan berkontribusi terhadap patogenesis *alopecia-like*⁵². Peningkatan ROS dikarenakan induksi *fluconazole* kemudian memfosforilasi IKK. Hal tersebut akan menyebabkan degradasi sehingga terjadi transkripsi sitokin inflamasi. Paparan *fluconazole* juga akan mengaktifasi STAT3 untuk mentranskripsikan SOCS3. SOCS3 meningkatkan aktivasi NF- κ B pada nukleus yang akhirnya mengaktifkan transkripsi sitokin inflamasi seperti IL-6⁶⁵.

MSC mensekresikan mediator-mediator dan *growth factor* yang disebut secretome yang mendukung regenerasi kulit, antara lain seperti sitokin antiinflamasi (IL-10) dan *transforming growth factor* (TGF β) yang berperan pada proses pertumbuhan rambut^{1,7}. Kondisi hipoksia akan semakin memicu MSC untuk mensekresikan molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator-mediator

antiinflamasi dan *growth factor*⁶¹. Hipoksia MSC disebut sebagai sekretom. Berbagai sitokin dan mediator yang muncul sebagai respon MSC terhadap adanya hipoksia, salah satunya adalah IL-10⁶⁴. Aktivitas sekretom akan turut mencegah produksi ROS akibat peran IL-10, mengaktifasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentranslokasi ke dalam nukleus untuk menggiring ekspresi gen responsive STAT3, yaitu SOCS3. SOCS juga menghambat translokasi NF- κ B ke dalam nukleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen proinflamasi⁵⁸. Berbagai sitokin tersebut yang diekspresikan pada medium, difiltrasi menggunakan TFF yang selanjutnya disebut sebagai SH-MSCs.

Growth factor (GF) dari sekresi *stem cells* akan mengaktifkan DPC untuk mengeluarkan protein seperti *stromal cell-derived factor 1* (SDF1), *Matrix metalloproteinase* (MMP3) dan *biglycan*. Protein tersebut akan berperan pada proses induksi pensinyalan Wnt. TGF- β berperan sebagai pengatur utama pertumbuhan folikel rambut dan inisiator utama fase anagen. Pada saat yang sama MMP3 menghambat jalur pensinyalan Wnt non-kanonik dengan menonaktifkan Wnt-5b. Wnt-5b adalah faktor penghambat untuk pensinyalan β -catenin / Wnt. Faktor sekretori DPC lainnya termasuk LTBP1 juga secara kovalen berikatan dengan TGF- β dan mengaktifkan jalur pensinyalan TGF- β . Hal ini akan mengarah pada aktivasi pada jalur Smad 2/3 di HFSCs, sehingga menghindari regenerasi rambut yang lambat. LTBP1 juga berpartisipasi dalam penghambatan jalur pensinyalan BMP (BMP4) sehingga memelihara perkembangan folikel rambut dan mempertahankan folikel ini dalam fase telogen¹.



Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari gel (10%) terhadap penurunan ekspresi IL-6 dan peningkatan ekspresi TGF- β pada tikus jantan galur Wistar model *Alopecia-like* antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

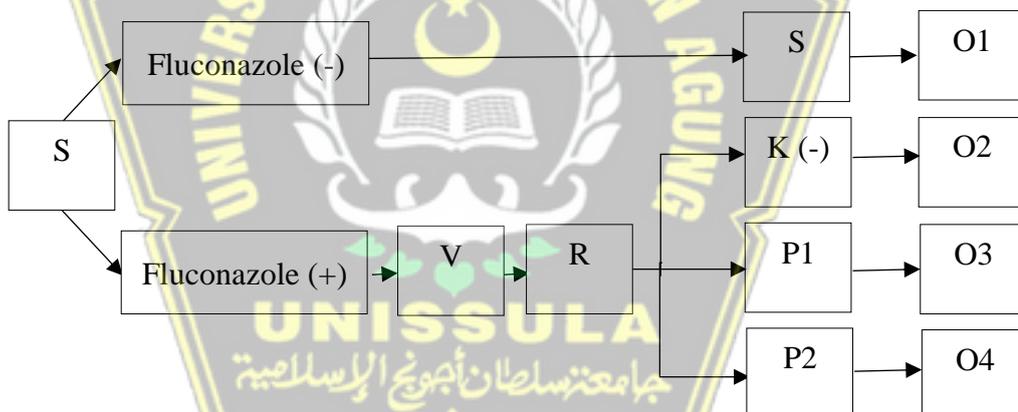


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo dengan menggunakan rancangan penelitian *Post test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang tidak mendapatkan intervensi (kontrol) dan 1 kelompok tikus sehat. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Gambar 6. Skema rancangan penelitian

Keterangan:

S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat

V : Validasi

R : Randomisasi

Kontrol : K: Kontrol Negatif (Tikus model *alopecia-like* dengan kontrol 100 mg base gel Nacl)

- Perlakuan : P1: Tikus model *alopecia-like* dengan pemberian gel topikal SH-MSCs 10% dengan dosis 200mg/tikus/hari
- Perlakuan : P2 : Tikus model *alopecia-like* dengan pemberian gel topikal SH-MSCs 20% dengan dosis 200mg/tikus/hari
- O: Observasi

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah Tikus Wistar jantan dengan umur 8-12 minggu dan berat 150-250 gram yang dinyatakan sehat. Tikus dicukur dan diinduksi *fluconazole* hingga pertumbuhan rambut terhambat seperti *alopecia-like*. Validasi muncul *alopecia-like* ditandai dengan terhambatnya pertumbuhan folikel rambut.

4.2.2. Sampel Penelitian

Sampel Penelitian ini adalah Tikus jantan yang dicukur dan diinduksi *fluconazole* sehingga memiliki gejala *alopecia-like* yang memenuhi kriteria inklusi dan telah memenuhi validasi *alopecia-like* yaitu mengalami perhambatan pertumbuhan rambut. Pengambilan sampel dilakukan satu kali pada hari ke-20 setelah pemberian pertama perlakuan.

4.2.2.1. Kriteria Inklusi :

- Tikus Putih wistar
- Tikus Jantan
- Bobot 150-250 gr
- Umur 8 sampai 12 minggu

- Tikus kondisi *alopesia-like* dengan perhambatan pertumbuhan rambut secara makroskopis, dan divalidasi dengan pemeriksaan histopatologis menggunakan pewarnaan HE.

4.2.2.2. Kriteria Eksklusi

- Memiliki kelainan anatomis
- Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya
- Tidak mengalami perhambatan pertumbuhan rambut

4.2.2.3. Kriteria Drop Out

Tikus yang mati selama penelitian

4.2.3. Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 4 kelompok yaitu Kelompok 1 (tikus sehat yang dicukur), Kontrol Negatif (tikus yang dicukur dan diinduksi *fluconazole* lalu diberi gel saline), P1 (tikus yang dicukur dan di induksi *fluconazole*, lalu diberikan terapi gel topikal SH-MSCs 10% dengan dosis 200mg/tikus/hari, dan P2 (tikus yang dicukur dan di induksi *fluconazole*, lalu diberikan gel topikal SH-MSCs 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari.

4.2.4. Besar Sampel

Besar sampel dihitung berdasarkan kriteria Federer yaitu 5 ekor per kelompok ditambah 1 ekor tiap kelompok sebagai cadangan. Berdasarkan kriteria tersebut, didapatkan besaran sampel dalam penelitian ini adalah 24ekor tikus yang dibagi menjadi 4 kelompok observasi, yaitu 1 kelompok yang tidak mendapat perlakuan dan 3 kelompok perlakuan, sehingga masing–masing perlakuan terdiri dari 6 ekor

tikus.

Besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini menggunakan rumus sampel eksperimental dari Federer 107, dengan rumus:

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

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

keterangan :

t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan

4.3. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

4.3.2. Variabel

4.3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah gel topikal SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200mg/tikus/hari yang diperoleh dari Lab SCCR.

4.3.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah ekspresi IL-6 & TGF- β .

4.3.2.3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah jenis kelamin, berat badan, umur tikus, pakan dan minum hewan coba.

4.3.2.4. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah genetik, suhu, kelembapan, siklus pencahayaan.

4.3.3. Definisi Operasional

Tabel 4.1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala
1	Gel SH-MSCs	Gel topikal yang mengandung molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSC dari Lab SCCR. SH-MSCs 10% dan 20% dioles pada tikus <i>alopesia-like</i> yang diinduksi <i>fluconazole</i> setiap 1x/hari pada area kebotakan dengan dosis 200 mg/tikus/hari.	Ordinal
2	IL-6	Ekspresi gen pada tikus wistar yang diambil dari jaringan kulit diperiksa pada hari ke 7 setelah di oles gel topikal SH-MSCs 10% dan 20%. Pengukuran <i>Interleukin 6</i> pada jaringan kulit dilakukan dengan metode <i>quantitative real time-polymerase chain reaction</i>	Rasio

		(qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk ekspresi relative (x).	
3	TGF- β	Ekspresi gen pada tikus Wistar yang diambil dari jaringan kulit diperiksa pada hari ke 7 setelah dioles gel topikal SH-MSCs 10% dan 20%. Pengukuran TGF- β pada jaringan kulit dilakukan dengan metode qRT-PCR yang disajikan dalam bentuk ekspresi relative (x)	Rasio

4.4. Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, *fluconazole* tablet oral, 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.

4.5. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, *dissecting kit*, flask 75T, mikroskop dan *dissecting set* untuk mengambil sampel kulit setelah perlakuan. 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 SH-MSC. Alat yang digunakan untuk analisis sitokin Interleukin 6 dan TGF- β yaitu qRT-PCR.

4.6. Cara Penelitian dan Alur Kerja

4.6.1. Cara penelitian

4.6.1.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.6.1.2. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

Seluruh proses dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.

1. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan ke *petri dish*, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS.
3. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplet yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.

7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplet baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%.

4.6.1.3. Proses Hipoksia

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

4.6.1.4. Pembuatan Sediaan Gel

1. Banyak gel yang diperlukan untuk satu kali pengolesan pada dorsal tikus dengan luas 2 cm x 2 cm membutuhkan 200 mg gel. Pada penelitian ini, SH-MSCs 1 μ L = setara dengan 1 mg karena 1 μ L SH-MSCs dilarutkan dalam 1 mg NaCl. Mengikuti penelitian terdahulu, penggunaan gel topikal SH-MSCs 100 μ L dan 200 μ L/kgBB pada tikus wistar jantan berat 200 gram, maka didapatkan dosis 20 μ L dan 40 μ L untuk masing masing P1 dan P2. Pembuatan

sediaan gel SH-MSc untuk P1 dilakukan dengan cara mencampurkan 20 mg larutan SH-MSc ditambah 20 mg NaCl dan 160 mg basis gel untuk mendapatkan total 200 mg gel dengan konsentrasi 10%. Pembuatan sediaan gel SH-MSc untuk P2 dilakukan dengan cara mencampurkan 40 mg larutan SH-MSc ditambah 160 mg basis gel untuk mendapatkan total 200 mg gel dengan konsentrasi 20%.

2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah mikroskop.

4.6.1.5. Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek

Percobaan

1. Untuk memunculkan *alopecia-like* maka tikus dilakukan proses pencukuran dan induksi dengan *fluconazole* sebesar (35 mg/kg/hari) selama 14 hari⁶⁴. Setelah 14 hari, terjadi perhambatan pertumbuhan rambut pada 18 tikus yang diinduksi *fluconazole* yang dilihat secara makroskopis menggunakan persentase dalam satuan pixel. Selanjutnya tikus *alopecia-like* dioles gel topikal setiap hari selama 7 hari yang mengandung SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari.
2. Tikus kontrol negatif diberikan perlakuan menggunakan *base gel* selama 7 hari.
3. Hewan coba ini diamati dan di bandingkan area yang dicukur dan dengan area yang mengalami pertumbuhan rambut menggunakan satuan *pixel* sampai hari ke-14. Pada hari ke 14-21, tikus *alopecia-like* juga dilakukan pengamatan dan

di bandingkan area yang dicukur dan dengan area yang mengalami pertumbuhan rambut menggunakan satuan *pixel*.

4. Tikus *alopecia-like* yang sudah diberi perlakuan kemudian dibius dengan campuran *ketamine* (60mg/kgbb) dan *xylazine* (20mg/kgbb). Kemudian dilakukan pemanenan Sampel kulit pada semua kelompok diambil untuk dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan *Hematoksilin-Eosin* (HE).

- a) Sampel kulit tikus pada semua kelompok diambil dan difiksasi dalam larutan NBF 10%
- b) Sampel kulit dibilas dengan alkohol 70% sampai bersih dari sisa larutan fiksatif.
- c) Sampel kulit dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 30 menit untuk proses dehidrasi.
- d) Sampel kulit dimasukkan ke dalam toluol sampai jernih atau transparan selama 1 jam.
- e) 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.

- f) *Embedding*, sampel kulit dari parafin murni ditanamkan ke dalam cetakan blok parafin yang telah berisi parafin cair dan ditunggu hingga parafin mengeras.
- g) Sampel kulit dalam blok paraffin diiris dengan ketebalan irisan sebesar 6 μm menggunakan mikrotom.
- h) Irisan sampel jaringan ditempelkan pada gelas benda dengan cara mengoleskan Mayer's albumin dan ditetesi sedikit akuades lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga irisan menempel dengan sempurna.
- i) Sediaan histologis dideparafinasi dengan cara dimasukkan ke dalam xylol selama 24 jam.
- j) *Staining* (pewarnaan) dilakukan dengan pewarna hematoksilin-eosin. Kandungan xylol diserap dengan kertas saring, kemudian berturut-turut dimasukkan ke alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, dan akuades masing-masing dilakukan selama 1-2 menit. Preparat dimasukkan ke dalam pewarna Hematoksilin selama 5-10 detik, lalu dibilas dengan air mengalir selama 10 menit. Proses selanjutnya preparat dicelupkan ke dalam alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70% masing-masing selama 3-5 menit. Preparat dimasukkan ke dalam eosin selama 5-10 menit, kemudian dicelupkan ke alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96% masing-masing selama 3-5 menit, lalu dikeringkan dengan kertas saring. Preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 15 menit, kemudian sediaan histologis ditetesi canada balsam.

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

4.6.1.6. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

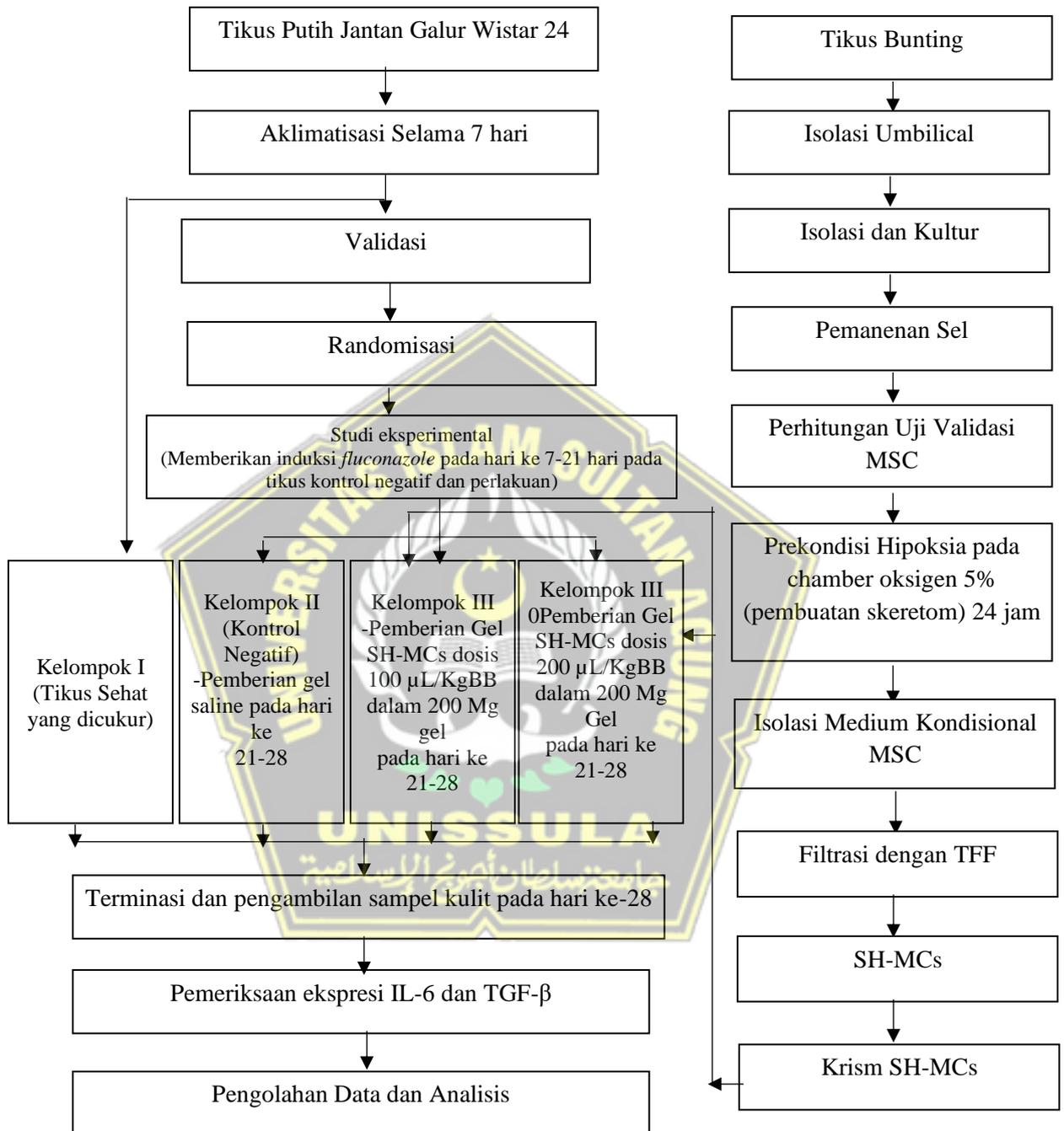
1. Sample darah diambil dan dilakukan proses sentrifugasi bertingkat menggunakan *Ficoll Paque* sehingga didapatkan PBMCs.
2. Sampel kulit difiksasi dalam formalin 10% dan dibuat menjadi blok paraffin.
3. Sampel kulit sebanyak 100 mg kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang telah terisi 50 mL RNA Iso Plus.
4. Sisi lain, PBMCs sebanyak 10^7 sel masing-masing ditransfer ke mikro tube dan diberi 50 mL RNA Iso Plus.
5. Potongan kulit ditumbuk menggunakan micropastle dan ditambahkan lagi RNA Iso Plus sebanyak 50 mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.
6. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
7. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.
8. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.

9. Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40⁰C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.
10. Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan (*Diethyl pyrocarbonat*) DEPC lalu bolak-balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40⁰C.
11. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50 µm. Campuran diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80⁰C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 ng.
12. Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 µL OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10 µL, kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70⁰C.
13. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 µL, DEPC-Treated H₂O 5 µL, ReverTraAce 1 µL. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 25⁰C selama 5 menit, 42⁰C selama 50 menit dan 85⁰C selama 5 menit.

4.6.1.7. Pembacaan Ekspresi Interleukin 6 dan TGF B dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

1. Pembacaan ekspresi IL 6 dan TGF- β dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*.
2. Campuran dari 3 μ L cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer, dan $MgCl_2$) sebanyak 12,5 μ L, primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6 μ L untuk primer forward dan reverse dan 8,3 μ L Nuclease Free Water.
3. PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine. Sekuens primer GADPH yang digunakan adalah F: 5'-GCG ACA GTC AAG GCT GAG AATG -3' dan R: 5'-TCT CGC TCC TGG AAG ATG GTGA -3'. Sekuens primer IL-6 yang digunakan adalah F: 5'-TCC TAC CCC AAC TTC CAA TGC TC-3' dan R: 5'-TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC-3'. Sekuens primer TGF- β yang digunakan adalah F: 5'-TAC CAT GCC AAC TTC TGT CTG GGA-3' dan R: 5'-ATG TTG GAC AAC TGC TCC ACC TTG-3'.
4. Peningkatan ekspresi gen dianalisis dalam ratio peningkatan terhadap house keeping gen dengan menggunakan *software EcoStudy*.

4.6.2. Alur Penelitian



4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data

kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.

Jika didapatkan sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Setelah didapatkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.

4.8. Jadwal dan Pelaksanaan penelitian

4.8.1. Tempat Penelitian

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

4.8.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus-November 2023.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

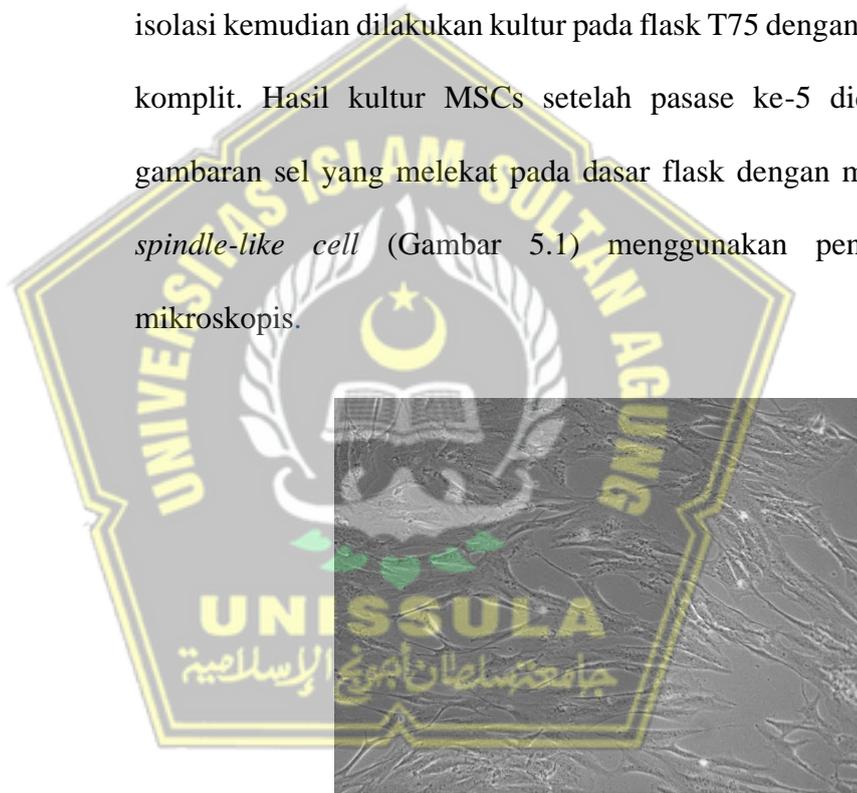
Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vivo* yang dilakukan pada bulan Agustus-November 2023 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) dan FK UNISSULA, Semarang, Jawa Tengah. Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi IL-6 dan ekspresi TGF- β pada tikus jantan galur *Wistar* model *Alopecia-like*. Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan galur *Wistar* model *Alopecia-like* sebagai subjek penelitian. Jumlah tikus yang digunakan adalah 24 ekor tikus sesuai kriteria *Federer*. Tikus pada penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu tikus sehat, tikus model *Alopecia-like* dengan kontrol 100mg base gel NaCL (kontrol negatif), tikus model *Alopecia-like* dengan perlakuan gel topikal SH-MSCs 10% dengan dosis 200 mg/tikus/hari (P1), dan tikus model *Alopecia-like* dengan perlakuan SH-MSCs 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari (P2). SH-MSCs yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari *Umbilical Cord* tikus usia kebuntingan 21 hari. Validasi SH-MSCs dilakukan dengan menggunakan analisis morfologi, marker permukaan sel, dan potensi diferensiasi. Analisis morfologi menggunakan mikroskop *inverted*, analisis marker permukaan sel menggunakan *flow cytometry*, dan analisis potensi diferensiasi adipogenik dan osteogenik menggunakan *Oil Red O* dan *Alizarin Red Staining*. Sel yang telah tervalidasi kemudian dikultur dan diinkubasi pada kondisi hipoksia (5% O₂). Medium kultur dikumpulkan dan difiltrasi dengan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF).

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Validasi MSCs

5.1.1.1. Morfologi MSCs

Isolasi SH-MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang, menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask T75 dengan medium komplet. Hasil kultur MSCs setelah pasase ke-5 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* (Gambar 5.1) menggunakan pengamatan mikroskopis.

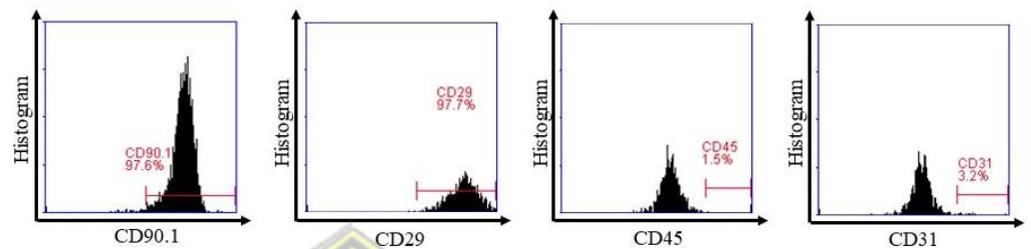


Gambar 5.1 Morfologi MSCs menyerupai sel fibroblast (ditunjuk anak panah) pada perbesaran 200x.

5.1.1.2. Surface Marker MSCs

Hasil isolasi MSCs divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Hasil secara kuantitatif berupa persentase ekspresi positif CD 90.1 (97,6%),

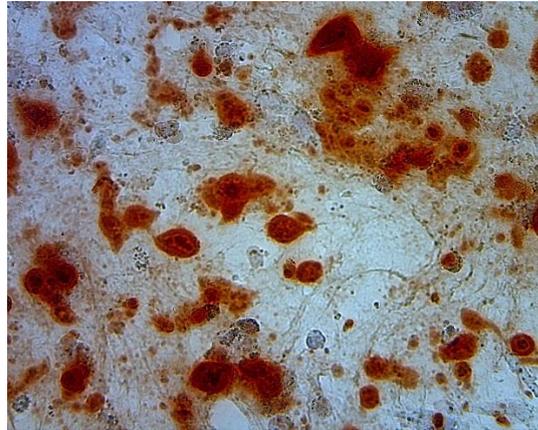
CD 29 (97,7%), dan ekspresi negatif dari CD 45 (1,5%), dan CD 31 (3,2%) (Gambar 5.2).



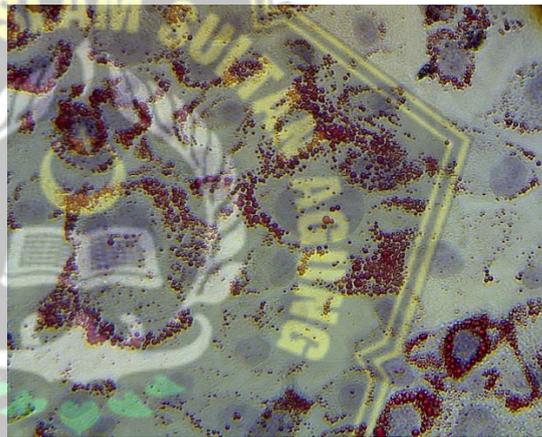
Gambar 5.2 Ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31 pada MSCs

5.1.1.3. Diferensiasi Osteogenik dan Adipogenik MSCs

Sel MSCs dikultur dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik selama 21 hari untuk mengetahui kemampuan diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit. Gambaran diferensiasi osteogenik MSCs ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarin Red* Gambar 3. Diferensiasi adipogenik MSCs ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi akumulasi droplet lipid dengan pewarnaan *Oil Red O* (Gambar 4). Deposisi kalsium dan lemak hasil diferensiasi MSCs menjadi osteosit dan adiposit ditunjukkan dengan warna merah pada masing-masing kultur.



Gambar 5.3 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit



Gambar 5.4 adiposit setelah pemberian pewarnaan *Alizarin Red* dan *Oil Red O* pada pembesaran 200x

5.1.1.4. Kandungan Biomolekul SH-MSCs

Setelah inkubasi UC-MSCs dalam kondisi hipoksia 24 jam, *conditioned media* (CM) dikoleksi dari medium pertumbuhan H-MSCs. Pada penelitian ini, peneliti mengisolasi sitokin dan *growth factor* yang terkandung dalam H-MSC-CM untuk memperoleh SH-MSCs murni. Peneliti menggunakan strategi TFF berdasarkan kombinasi kategori

batas berat molekul mengenai penelitian sebelumnya. Peneliti mengisolasi molekul menggunakan kaset filter 10-50 kDa 50%, 50-100 kDa 25%, dan 100-300 kDa 25%. Setelah penyaringan, peneliti mengkarakterisasi tingkat sitokin dan *growth factor* yang terkandung dalam SH-MSCs menggunakan uji ELISA (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Kandungan Sitokin dan *Growth Factor* pada SH-MSCs.

Biomolekul	Kadar \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 Efek Pemberian SH-MSCs terhadap Ekspresi TGF- β dan ekspresi IL-6

Penelitian pengaruh sekretom sel punca mesenkimal hipoksia terhadap ekspresi IL-6 dan ekspresi TGF- β Tikus Galur Wistar yang di induksi *fluconazole* telah dilakukan selama 21 hari sehingga tikus menjadi Model *Alopecia-Like*. Hasil penelitian tersebut tertera pada tabel

5.2

Tabel 5.2 Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada ekspresi IL-6 dan ekspresi TGF- β

Variabel	Kelompok				Sig.(p)
	S	K N=6	P1 N=6	P2 N=6	
Ekspresi IL-6 (ng/L)					
Mean	1.000	3.026	2.454	1.419	
Std.deviasi	0.141	0.133	0.225	0.134	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.960*	0.346*	0.584*	0.591*	
<i>Levene Test</i>					0.686**
<i>One Way Anova</i>					0.000***
Ekspresi TGF-β					
Mean	1.000	0.683	1.302	3.176	
Std.deviasi	0.141	0.183	0.131	0.394	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.960*	0.434*	0.144*	0.007	
<i>Levene Test</i>					
<i>Kruskall Wallis</i>					0.000***
Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$					

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa rerata ekspresi IL-6 terendah yaitu pada kelompok tikus sehat (S), kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan (P2) tikus model *Alopecia-like* dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 200 μ L/kgBB dalam 200 mg gel, dan diikuti oleh kelompok perlakuan (P1) tikus model *Alopecia-like* dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 100 μ L/kgBB dalam 200 mg gel. Rerata ekspresi IL-6 tertinggi adalah kelompok kontrol negatif (K-) Tikus model *alopecia-like* dengan kontrol 200 mg base gel NaCl. Seluruh kelompok kadar ekspresi IL-6 berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai p-value > 0.05 dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* hasilnya homogen nilai p-value 0.561 ($p > 0.05$) maka analisis data menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai pvalue 0.000

($p < 0.05$), kemudian dilanjutkan dengan uji *Pos Hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

Rerata rerata ekspresi TGF- β tertinggi pada tabel 5.2 yaitu pada kelompok perlakuan (P2) tikus model *Alopecia-like* dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 200 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ dalam 200 mg gel, kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan (P1) tikus model *Alopecia-like* dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 100 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ dalam 200 mg gel, dan diikuti oleh kelompok tikus sehat (S). Rerata ekspresi TGF- β terendah adalah kelompok kontrol negatif (K-) Tikus model *alopecia-like* dengan kontrol 200 mg base gel NaCl. Seluruh kelompok ekspresi ekspresi TGF- β berdasarkan uji *shapiro wilk* terdapat salah satu kelompok yaitu kelompok perlakuan (P2) tidak berdistribusi normal dengan nilai 0.007 $p\text{-value} < 0.05$. Maka analisis data menggunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai $p\text{-value}$ 0.001 ($p < 0.05$). Kemudian dilanjutkan menggunakan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

5.1.2.1 Perbedaan Ekspresi IL-6 Antar Kelompok

Perbedaan ekspresi IL-6 antar 2 kelompok diketahui uji *Post Hoc LSD* seperti yang disajikan di tabel 5.3.

Tabel 5.3 Perbedaan Ekspresi IL-6 Antar 2 Kelompok

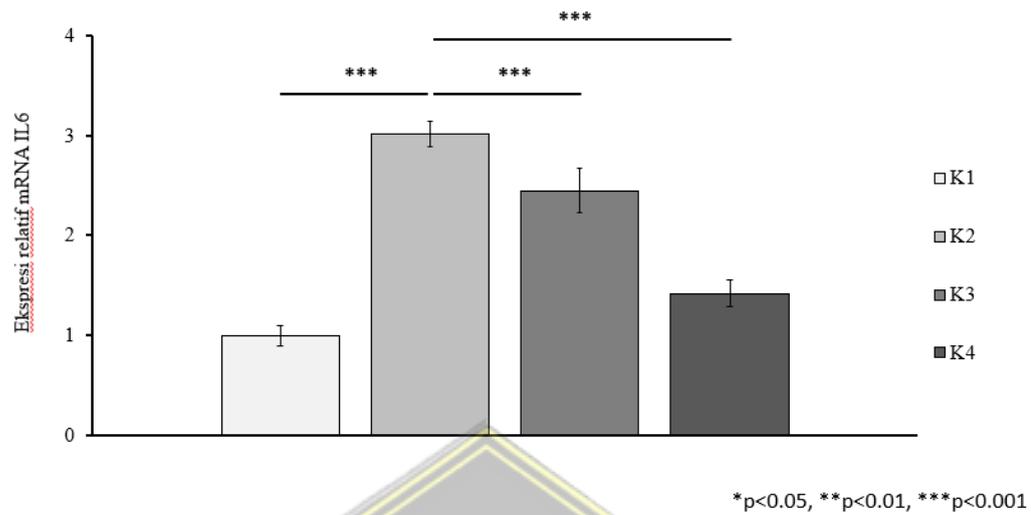
Kelompok	<i>p-Value</i>
S vs K	0.000*
S vs P1	0.000*
S vs P2	0.000*
K vs P1	0.000*
K vs P2	0.000*

P1 vs P2

0.000*

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

Hasil uji *Post Hoc LSD* pada tabel 5.3 menunjukkan ekspresi IL-6 pada kelompok tikus sehat (S) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (K) nilai p-value 0.000 ($p < 0.05$), kelompok tikus sehat (S) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (P1) nilai p-value 0.000 ($p < 0.05$), dan kelompok tikus sehat (S) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (P2) nilai p-value 0.000 ($p < 0.05$). Kelompok (K) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (P1) dengan nilai p-value 0.000 ($p < 0.05$) dan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok (K) terhadap (P2) dengan nilai p-value 0.000 ($p < 0.05$). Kemudian kelompok (P1) terhadap (P2) juga terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai p-value 0.000 ($p < 0.05$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian gel SH-MSCs dosis 10% dan 20% dalam 200 mg gel berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi IL-6 pada tikus jantan galur wistar model alopecia-like sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.5. Ekspresi Relatif IL-6

5.1.2.2 Perbedaan Ekspresi TGF- β Antar Kelompok

Perbedaan ekspresi TGF- β antar 2 kelompok diketahui uji *Kruskal Wallis* dengan uji *Mann-Whitney* seperti yang disajikan di tabel 5.4.

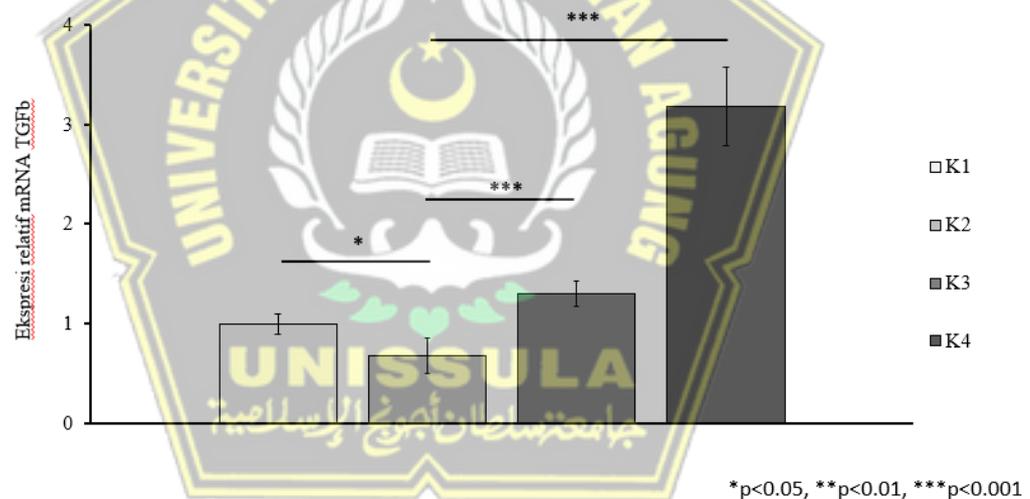
Tabel 5.4 Perbedaan Ekspresi TGF- β Antar 2 Kelompok

Kelompok	<i>p</i> -Value
S vs K	0.010*
S vs P1	0.010*
S vs P2	0.004*
K vs P1	0.056
K vs P2	0.000*
P1 vs P2	0.004*

*Uji *Mann Whitney* dengan nilai signifikan $p < 0.05$

Hasil uji *Mann Whitney* pada tabel 5.4 menunjukkan ekspresi TGF- β pada kelompok tikus sehat (S) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (K) nilai *p*-value 0.010 ($p < 0.05$), kelompok tikus sehat (S) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (P1) nilai *p*-value 0.010 ($p < 0.05$), dan kelompok tikus sehat (S) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (P2) nilai *p*-value 0.004 ($p < 0.05$). Kelompok (K) tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (P1) dengan nilai *p*-value 0.056 ($p < 0.05$) dan terdapat

perbedaan signifikan pada kelompok (K) terhadap (P2) dengan nilai p-value 0.000 ($p < 0.05$). Kemudian kelompok (P1) terhadap (P2) juga terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai p-value 0.004 ($p < 0.05$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian gel SH-MSCs dosis 10% tidak berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan ekspresi TGF- β sehingga pernyataan hipotesis ditolak. Pemberian gel SH-MSCs 20% dalam 200 mg gel berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan ekspresi TGF- β pada tikus jantan galur wistar model alopecia-like sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.6. Ekspresi Relatif mRNA TGF- β

5.2. Pembahasan

Rambut rontok ditentukan oleh bermacam-macam faktor: diwariskan (trikodistrofi dan *alopecia* androgenetik), kondisi komorbiditas yang menyertainya, kerusakan hormon (penyakit organ tiroid, resistensi insulin), sistem kekebalan tubuh (alopesia dan lupus erythematosus), nutrisi buruk,

elemen lingkungan (obat-obatan, radiasi ultraviolet (UV)), gangguan mental (stres dan trikotilomania), dan penuaan. Faktor-faktor tersebut merugikan dan mempengaruhi siklus rambut sehingga mengurangi aktivitas sel induk dan membutuhkan waktu untuk pemulihan folikel rambut.¹

Stres yang dirasakan (internal atau eksternal) dapat merangsang perubahan kekebalan neuroendokrin. Telah ditunjukkan bahwa stres berkepanjangan dapat meningkatkan sitokin inflamasi (misalnya INF- γ) yang menyebabkan inflamasi dan berakhir pada apoptosis, penuaan sel dan transisi catagen prematur. DPC dalam folikel rambut memiliki reseptor untuk *corticotropin releasing factor* (CRF). CRF menghambat pemanjangan batang rambut dan proliferasi DPC melalui penangkapan divisi pada fase G2 / M. Selain itu, ini menyumbang akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) yang juga menghentikan siklus sel. CRF menurunkan tingkat ekspresi sitokin terkait anagen, seperti: *hepatocyte growth factor* (HGF), Wnt5a, TGF β , dan *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). Stres akibat rambut rontok berkontribusi terhadap umpan balik negatif yang meningkatkan insiden kerontokan rambut.²

Hair Follicle (HF) adalah bintik-bintik yang secara imunologis, mirip dengan otak besar, mata, dan gonad, dan mereka dipengaruhi oleh sistem neuroendokrin-imun. Pada kondisi fisiologis, hal ini dipengaruhi oleh: (1) Ekspresi rendah atau tidak munculnya prinsip antigen MHC I, (2) adanya sel Langerhans yang tidak berfungsi, dan (3) ekspresi lokal zat immunosupresif (TGF- β 1 dan α -melanosit MSH). Disimpulkan dari ini adalah bahwa HF dapat dengan mudah digunakan dalam transplantasi.¹⁶

MSC secara aktif berpartisipasi dalam angiogenesis melalui diferensiasi langsung, interaksi kontak sel dengan turunan sel endotel, dan melepaskan faktor pro-angiogenik secara parakrin. Faktor parakrin dapat meningkatkan suplai darah dari jaringan yang rusak melalui aktivasi dan rekrutmen sel punca dan sel progenitor. MSC memiliki beberapa faktor angiogenesis, termasuk *interleukin-8* (IL-8), *Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF-1), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Faktor-faktor pro-angiogenik ini mampu membentuk jaringan pembuluh darah dan meningkatkan migrasi turunan sel endotel *in vitro*. Selain sekresi faktor angiogenik oleh MSC, terungkap bahwa berbagai faktor yang ada dalam sekretom dapat mengaktifkan sifat angiogenik dalam sel endotel. Sebagai contoh, MSC mempengaruhi pertumbuhan rambut melalui proliferasi sel untuk memperpanjang fase anagen (FGF-7), menginduksi pertumbuhan sel (aktivasi ERK), merangsang perkembangan folikel rambut (β -catenin), dan menekan isyarat apoptosis (pelepasan BCL-2 dan aktivasi Akt).¹

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi IL-6 mengalami penurunan yang sangat signifikan dibanding kelompok kontrol negatif. Kemudian pada ekspresi TGF- β mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan SH-MSCs memiliki pengaruh terhadap ekspresi IL-6 dan ekspresi TGF- β . Hal ini diduga karena kandungan lain dari SH-MSCs adalah TGF- β yang mana TGF- β dapat mengaktivasi fosforilasi SMAD2/3 untuk ditranslokasi ke nukleus dan menginduksi ekspresi sitokin anti-inflamasi⁵⁹. Mempertahankan MSCs sangat

penting untuk homeostasis jaringan dalam perbaikan. Pembelahan mereka tidak sering terjadi pada organisme dewasa, dan sebagian besar mereka dalam keadaan tidak prima. Dengan demikian, sangat penting untuk memahami komponen aktivasi dan induksi mereka, yang akan memungkinkan penggunaan sel multipoten dalam operasi plastik regeneratif dan pertumbuhan kembali pada rambut. Penggunaannya diperumit oleh fakta bahwa ekspresi reseptor pada berbagai faktor pertumbuhan dan efek lingkungan mikro dapat bervariasi.¹⁶ Kadar TGF- β meningkat di hari ke tujuh disebabkan oleh fase proliferasi. Lebih tinggi dibanding kelompok sehat karena sedang di fase inflamasi. Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa agregasi platelet dan pelepasan ADP, PDFG, faktor pertumbuhan tumor b (TGF β), dan CXCL4 mengaktifkan sel lokal (fibroblas dan keratinosit) dan kaskade imun untuk memulai inflamasi. Keratinosit, sebagai jenis sel utama epidermis, melepaskan sitokin proinflamasi dan peptida dan protein antimikroba (AMP). Bersama-sama, respon imun ini bertujuan untuk mendekontaminasi dasar luka dengan merekrut neutrofil dan makrofag ke alopecia.⁶⁷

Masing-masing dosis pada pemberian gel topikal SH-MSCs memperlihatkan penurunan ekspresi IL-6 dan peningkatan ekspresi TGF- β yang berbeda hal ini mengindikasikan bahwa setiap dosis menunjukkan respon yang berbeda terhadap ekspresi IL-6 dan ekspresi TGF- β yang berarti setiap dosis tersebut memiliki respon terhadap inflamasi yang berbeda pula. Jika dibandingkan antara kedua dosis tersebut pada dosis 10% dan 20% sama sama dapat menurunkan ekspresi IL-6 dibandingkan kelompok kontrol. Penelitian

ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa 23 minggu setelah perawatan terakhir menggunakan MSC terjadi peningkatan ketebalan rambut rata-rata ($29 \pm 5,0\%$) di atas nilai awal untuk area yang ditargetkan. 12 minggu setelah injeksi terakhir dengan A-PRP rata-rata jumlah rambut dan kepadatan rambut ($31 \pm 2\%$) meningkat secara signifikan¹⁶. Penelitian lain juga mengatakan bahwa di antara tiga puluh lima protein pensinyalan yang dianalisis, kadar VEGF, EGF, IL-6, Eotaxin, MCP-3, IFN γ -inducible protein-10 dan MIP-1 α lebih tinggi di zona kebotakan dibandingkan dengan zona periumbilikal¹⁰. Gel topikal SH-MSCs 20% menunjukkan peningkatan ekspresi TGF- β dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan gel topikal SH-MSCs 10% tidak menunjukkan peningkatan ekspresi TGF- β dibandingkan kelompok kontrol. Penelitian ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang membandingkan antara MSC-CM-T dosis 10% dan 20% untuk menyembuhkan luka. Pada penelitian tersebut didapatkan MSC-CM-T dosis 20% lebih efektif dalam menginisiasi peningkatan tingkat penutupan luka⁶⁶.

Kelemahan dari penelitian ini adalah tidak dilakukan pemeriksaan histopatologi CD45 dan CD68 untuk mengetahui keberadaan limfosit dan makrofag inflamasi (M1) setelah pemberian gel SH-MSCs dan pada penelitian ini tidak diketahui berapa lama dilakukan pengolesan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Pemberian gel SH-MSCs 10% dan 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari dapat menurunkan ekspresi gen IL-6.
2. Pemberian gel SH-MSCs 10% dengan dosis 200 mg/tikus/hari tidak meningkatkan ekspresi gen TGF- β .
3. Pemberian gel SH-MSCs dengan dosis 20% dengan dosis 200 mg/tikus/hari dapat meningkatkan ekspresi gen TGF- β .

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi CD45 dan CD68 untuk mengetahui keberadaan limfosit dan makrofag inflamasi (M1) setelah pemberian gel SH-MSCs.
2. Untuk peneliti selanjutnya diharapkan untuk meneliti lebih lama lagi durasi pengolesan gel SH-MSCs.

DAFTAR PUSTAKA

1. Salhab O, Khayat L, Alaaeddine N. *Stem cell secretome as a mechanism for restoring hair loss due to stress, particularly alopecia areata: narrative review. J Biomed Sci.* 2022 Oct 5;29(1):77.
2. Deng W, Zhang Y, Wang W, Song A, Mukama O, Huang J, et al. *Hair follicle-derived mesenchymal stem cells decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce inflammation around the hair follicle. Stem Cell Res Ther.* 2021 Dec 21;12(1):548.
3. Lee HH, Gwillim E, Patel KR, Hua T, Rastogi S, Ibler E, et al. *Epidemiology of alopecia areata, ophiasis, totalis, and universalis: A systematic review and meta-analysis. J Am Acad Dermatol.* 2020 Mar;82(3):675–82.
4. Simakou T, Butcher JP, Reid S, Henriquez FL. *Alopecia areata: A multifactorial autoimmune condition. J Autoimmun.* 2019 Mar;98:74–85.
5. Thompson JM, Park MK, Qureshi AA, Cho E. *Race and Alopecia Areata amongst US Women. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* 2018 Jan;19(1):S47–50.
6. Uzuncakmak TK, Engin B, Serdaroglu S, Tuzun Y. *Demographic and Clinical Features of 1,641 Patients with Alopecia Areata, Alopecia Totalis, and Alopecia Universalis: A Single-Center Retrospective Study. Skin Appendage Disord.* 2021;7(1):8–12.
7. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, Amansyah F, Amansyah F, Berlian MA, et al. *Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. F1000Research.* 2021;10:1–19
8. Jeon SH, Hyunju KIM, Jong Hyuk Sun. *Hypoxia enhances the hair growth-promoting effects of embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells via NADPH oxidase 4. J Biomed Pharmacotherapy.* 2023 Mar;159:114303
9. Kim JE, Oh JH, Woo YJ, Jung JH, Jeong KH, Kang H. *Effects of mesenchymal stem cell therapy on alopecia areata in cellular and hair follicle organ culture models. Exp Dermatol.* 2020 Mar 21;29(3):265–72.
10. Andjelkov K, Eremin II, Korac A. *Different levels of EGF, VEGF, IL-6, MCP-1, MCP-3, IP-10, Eotaxin and MIP-1α in the adipose-derived stem cell*

- secretome in androgenetic alopecia. Exp Dermatol.* 2022 Jun 19;31(6):936–42.
11. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. *IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Oct; 6(10): a016295.
 12. El-Refai AM , Elhabak DM, Khashaba RA . *More is Not Always Better in Hair Growth Factors. Epidermal Growth Factor: Hair Growth Factor Involved in Alopecia Areata Pathogenesis. Int J Trichology.* 2020 Jul-Aug; 12(4): 182–187.
 13. Walker C, Kelly E, James T et al. *Hair Growth in a Patient with Alopecia. J Skin Appendage Disord* (2021) 7 (5): 408–412.
 14. Aisyah R, Jatmik SW. Jalur Sinyal Tgf-B Berperan Dalam Self Renewal, Diferensiasi, Dan Proliferasi stem Cell. *Jurnal Saintika Medika* Vol 15, No.1, Juni 2019.
 15. Young L, Jehim K, Jemin K, et al. *The Effect of Conditioned Media From Human Adipocyte-Derived Mesenchymal Stem Cells on Androgenetic Alopecia After Nonablative Fractional Laser Treatment. J Dermatologic Surgery* 46(12):p 1698-1704, December 2020.
 16. Gentile P, Maria G, Allesandra B, et al. *Platelet-Rich Plasma and Micrografts Enriched with Autologous Human Follicle Mesenchymal Stem Cells Improve Hair Re-Growth in Androgenetic Alopecia. J. Biomedicines.* 2019 Jun; 7(2): 27
 17. Ho Bak D, Mi J, Soon R, et al. *Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells engineered to overexpress growth factors accelerate outcomes in hair growth. Korean J Physiol Pharmacol.* 2018 Sep; 22(5): 555–566
 18. Keystone E, ,Mohammed A. Omair. *Interleukin 6. Rheumatology (Sixth Edition) Volume 1*, 2015, Pages 485-491
 19. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. *Interleukin (IL-6) Immunotherapy. Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Aug;10(8):a028456.
 20. Calvo IF, Salgado CM. *TGFB1 (transforming growth factor beta 1). Atlas genetic cytogenetic oncology haematology*, 2013.
 21. Gonzalez A, et al. *Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. World J Stem Cells.* 2020 Dec 26; 12(12): 1529–1552.

22. Aisyah R, Jatmiko SW. Jalur Sinyal TGF- β Berperan Dalam Self Renewal, Diferensiasi, Dan Proliferasi Stem Cell. *Saintika Medika*. 2019 Jun 29;15(1):50.
23. Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJP. *Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential*. *Stem Cells Int*. 2015;2015:1–12.
24. Chang, Pauklin. *ROS and TGF β : from pancreatic tumour growth to metastasis* *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2021) 40:152
25. Agung Putra. *BASIC MOLECULAR STEM CELL*. 1st ed. Unissula Press; 2019.
26. Chaigne A, Labouesse C, White IJ, Agnew M, Hannezo E, Chalut KJ, et al. *Abscission Couples Cell Division to Embryonic Stem Cell Fate*. *Dev Cell*. 2020 Oct;55(2):195-208.e5.
27. Widowati W, Widyanto R. Sel Punca sebagai Transformasi Alternatif Terapi. *Zenit*. 2015;2(1):1–5.
28. Salhab O, Khayat L, Alaaeddine N. *Stem cell secretome as a mechanism for restoring hair loss due to stress, particularly alopecia areata: narrative review*. *J Biomed Sci*. 2022 Oct 5;29(1):77.
29. Charitos IA, et al. *Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues*. *Stem Cells Int*. 2021 Apr 29;2021:1–11.
30. Suparno AC, Rubinadzari N, Kasasiah A. Generasi Berikutnya: Sel Punca Mesenkim Sebagai Sistem Penghantaran Obat Berbasis Sel. *Majalah Farmasetika*. 2022 Mar 2;7(2):121.
31. Ducret M, et al. *Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach*. *J Endod*. 2015 Sep;41(9):1492–9.
32. Lukomska B, et al. *Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy*. *Stem Cells Int*. 2019 Apr 9;2019:1–10.
33. Dlouhy BJ, et al. *Autograft-derived spinal cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient*. *J Neurosurg Spine*. 2014 Oct;21(4):618–22.
34. Codinach M, et al. Design and validation of a consistent and reproducible manufacture process for the production of clinical-grade bone marrow–derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 2016, 18(9), 1197–1208.

35. Rodriguez LA, Mohammadipoor A, Alvarado L, Kamucheka RM, Asher AM, Cancio LC, et al. *Preconditioning in an Inflammatory Milieu Augments the Immunotherapeutic Function of Mesenchymal Stromal Cells*. *Cells*. 2019 May 15;8(5):462.
36. Fatemeh Mohammadali 1 Saeid Abroun, 1, and Amir Atashi. *Mild hypoxia and human bone marrow mesenchymal stem cells synergistically enhance expansion and homing capacity of human cord blood CD34+ stem cells*. *Iran J Basic Med Sci*. 2018 Jul;21(7):709–16.
37. Muhar AM, Putra A, Warli SM, Munir D. *Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells Inhibit Intra-Peritoneal Adhesions Formation by Upregulation of the IL-10 Expression*. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019 Dec 11;7(23):3937–43.
38. Uysal E, Dokur M, Kirdak T, Kurt A, Karadag M. *Evaluation of the effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on intraperitoneal adhesions*. *Turk J Surg*. 2018 Sep 28;34(3):184–90.
39. Karaca G, Pehlivanli F, Aydin O, Altunkaya C, Uzun H, Niyaz M, et al. *The effect of mesenchymal stem cell use on intra-abdominal adhesions in a rat model*. *Ann Surg Treat Res*. 2018;94(2):57.
40. Gupta M, Mysore V. *Classifications of patterned hair loss: a review*. *J Cutan Aesthet Surg*. 2016;9(1):3.
41. Olsen EA, Iorizzo M. *Hair Disorders*. In: *Harper's Textbook of Pediatric Dermatology*. Wiley; 2019. p. 2103–38.
42. Buffoli B, et al. *The human hair: from anatomy to physiology*. *Int J Dermatol*. 2014 Mar;53(3):331–41.
43. Natarelli N, et al. *Academic Editor Integrative and Mechanistic Approach to the Hair Growth Cycle and Hair Loss*. *J cLin Med*. 2023 Feb; 12(3): 893.
44. Simakou T, Butcher JP, Reid S, Henriquez FL. *Alopecia areata: A multifactorial autoimmune condition*. *J Autoimmun*. 2019 Mar;98:74–85.
45. Scollan ME, Breneman A, Kinariwalla N, Soliman Y, Youssef S, Bordone LA, et al. *Alopecia areata after SARS-CoV-2 vaccination*. *JAAD Case Rep*. 2022 Feb;20:1–5.
46. Meah N, Wall D, York K, Bhojru B, Bokhari L, Sigall DA, et al. *The Alopecia Areata Consensus of Experts (ACE) study: Results of an international expert opinion on treatments for alopecia areata*. *J Am Acad Dermatol*. 2020 Jul;83(1):123–30.

47. Barton VR, Toussi A, Awasthi S, Kiuru M. *Treatment of pediatric alopecia areata: A systematic review*. J Am Acad Dermatol. 2022 Jun;86(6):1318–34.
48. Stefanantio CM. *Histopathologic diagnosis of alopecia: clues and pitfalls in the follicular microcosmos*. Diagnostic Histopathology. Volume 26, Issue 3, March 2020, Pages 114-127
49. Kartika Paramita MYLR. *Gambaran Dermoskopik Pasien Alopesia*. - Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin. 2015;27(3):163–9.
50. Wikramanayake TC, et al. *A novel rat model for chemotherapy-induced alopecia*. Clin Exp Dermatol. 2013 Apr
51. Patel S, et al. *Evaluation of hair growth promoting activity of Phyllanthus niruri Avicenna J Phytomed*. 2015 Nov-Dec; 5(6): 512–519
52. Thompson GR, Krois CR, Affolter VK, Everett AD, Varjonen EK, Sharon VR, et al. *Examination of Fluconazole-Induced Alopecia in an Animal Model and Human Cohort*. Antimicrob Agents Chemotherapy. 2019 Feb;63(2).
53. Routsis C, Meletiadis J, Charitidou E, Gkoufa A, Kokkoris S, Karageorgiou S, et al. *Epidemiology of Candidemia and Fluconazole Resistance in an ICU before and during the COVID-19 Pandemic Era*. Antibiotics. 2022 Jun 4;11(6):771.
54. Mahl C, Camile SB, Fernanda SH. *Induction of ROS generation by fluconazole in Candida glabrata: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage*. J Diagn Microbiol Infect Dis. 2015 Jul;82(3):203-8.
55. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. *Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells*. Universa Medicina. 2019 Oct 16;38(3):164–71.
56. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. *NF- κ B signaling in inflammation*. Signal Transduct Target Therapy. 2017;2(April).
57. Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupar J, Yang X, et al. *TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers*. Oncogene. 2013;32(12):1549–5.
58. Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. *The Regulatory Role of IL-10 in Neurodegenerative Diseases*. Biomolecules. 2020 Jul 9;10(7):1017.
59. Chang, Pauklin. *ROS and TGF β : from pancreatic tumour growth to metastasis* Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (2021) 40:152

60. Lima MLR, et al. *A Novel Wistar Rat Model of Obesity-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Sucrose-Rich Diet. J Diabetes Res.* 2016;2016:1–10.
61. Al-Rejaie SS, Abuhashish HM, Ahmed MM, Arrejaie AS, Aleisa AM, AlSharari SD. *Telmisartan inhibits hyperalgesia and inflammatory progression in a diabetic neuropathic pain model of Wistar rats. Neurosciences.* 2015 Apr 13;20(2):115–23.
62. Ghasemi A, et al. *The laboratory rat: Age and body weight matter. EXCLI Journal* 2021; 20: 1431–1445.
63. Sengupta P. *The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med.* 2013 Jun; 4(6): 624–630.
64. Shimizu Y, Ntege E.H, Sunami H, Inoue Y. *Regenerative medicine strategies for hair growth and regeneration: A narrative review of literature. J. Regenerative Therapy.* 2022. 527-539
65. Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. *The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. Biomolecules* 2020;10:1-15.
66. Kuntardjo N, dkk. *Topical gel of mesenchymal stem cells-conditioned medium under TNF- α precondition accelerates wound closure healing in full-thickness skin defect animal model. J Med Life.* 2022 Feb;15(2):214-221