

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (EH-MSCs)
TERHADAP KADAR TGF- β DAN PDGF
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus model *Alopecia-like*
yang diinduksi Fluconazole)**

TESIS

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



Magister Ilmu Biomedik

**Yoshi Puspitasari
MBK.23.22.010395**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2024**

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (EH-MSCs) TERHADAP KADAR TGF- β DAN PDGF (STUDI EKSPERIMENTAL *IN VIVO* PADA TIKUS MODEL *ALOPECIA-LIKE* YANG DIINDUKSI FLUCONAZOLE)

disusun oleh

Yoshi Puspitasari

MBK.23.22.010395

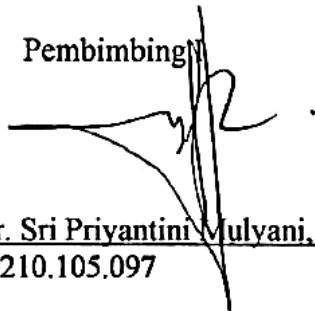
yang dipertahankan didepan Tim Penguji

pada tanggal 22 Januari 2025

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
NIK. 210.113.160

Mengetahui,

Ketua program Studi Magister Ilmu Biomedis
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
NIK.210.113.160

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, 17 Januari 2025



(Yoshi Puspitasari)

KATA PENGANTAR

Puji syukur terpanjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga tesis dengan judul **“Pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) terhadap kadar TGF- β dan PDGF (Studi eksperimental *In Vivo* Pada Tikus model *Alopecia-like* yang diinduksi *Fluconazole*)”** ini dapat penulis selesaikan.

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, kepada:

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. H. Gunarto, SH, MH
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak DR. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B
4. Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp.A atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing pertama.
5. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.

6. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med selaku penguji pertama yang banyak memberikan tambahan ilmu, serta masukan dan pengarahan dalam tesis.
7. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku penguji kedua yang telah memberikan banyak saran-saran dalam penyelesaian tesis.
8. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku penguji ketiga yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
10. Segenap staf administrasi program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
11. Kedua orang tua dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doanya.
12. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Dengan keterbatasan pengalaman, ilmu maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan pengembangan lanjut agar benar-benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar tesis ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan.

Semarang, Januari 2025

Penulis

(Yoshi Puspitasari)



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
ABSTRAK	xvi
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Umum	7
1.3.2 Khusus	7
1.4 Originalitas Penelitian	8
1.5 Manfaat Penelitian	10
1.5.1 Teoritis	10
1.5.2 Praktis	10
II. TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Alopecia	11

2.1.1 Definisi	11
2.1.2 Alopecia Areata (AA)	11
2.2 <i>Transforming Growth factor-β</i> (TGF- β)	15
2.2.1 Definisi	15
2.2.2 Peran TGF- β pada Alopecia	17
2.2.3 Faktor yang Mempengaruhi Produksi TGF- β	17
2.3 <i>Platet Derived Growth Factor</i> (PDGF)	19
2.3.1 Definisi	19
2.3.2 Peran PDGF pada Alopecia	20
2.3.3 Faktor yang Mempengaruhi Kadar PDGF	23
2.4 Hipoksia	25
2.5 <i>Exosome hypoxia</i> MSC (EH-MSC)	26
2.5.1 Definisi	26
2.5.2 Kandungan <i>Exosome</i> MSC	26
2.5.3 Metode Isolasi <i>Exosome</i> MSC	28
2.6 Efek <i>Exosome hypoxia mesenchymal stem cell</i> terhadap kadar TGF- β dan PDGF pada Alopecia	30
III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	32
3.1 Kerangka Teori	32
3.2 Kerangka Konsep	37
3.3 Hipotesis.....	37
IV. METODE PENELITIAN	38
4.1 Jenis penelitian dan rancangan penelitian	38

4.2	Variabel penelitian dan Definisi Operasional	39
4.3	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	41
4.4	Teknik Pengambilan Sampel Penelitian	42
4.5	Besar sampel	43
4.6	Alat dan Bahan	44
4.7	Cara Penelitian.....	45
4.8	Alur penelitian	54
4.9	Analisa Data	55
4.10	Tempat dan Waktu Penelitian.....	55
V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	56
5.1	Hasil Penelitian	56
5.1.1	Hasil Validasi EH-MSC	56
5.1.2	Hasil Validasi Alopecia-like	58
5.1.3	Kadar TGF- β	61
5.1.4	Kadar PDGF	64
5.2	Pembahasan Hasil Penelitian	66
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	72
6.1	Kesimpulan	72
6.2	Saran	72
	DAFTAR PUSTAKA	73
	LAMPIRAN	83

DAFTAR SINGKATAN

AA	: Alopecia Areata
TGF- β	: Transforming Growth Factor Beta
TGF- β 1	: Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1)
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PDGF-A	: Platelet-Derived Growth Factor A
PDGF-AA	: Platelet-Derived Growth Factor-AA
PDGF-BB	: Platelet-Derived Growth Factor-BB
MSC	: Mesenchymal Stem Cell
EH-MSC	: Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell
ADSC-Exos	: Adipose-Derived Stem Cell Exosomes
HLA	: Human Leukocyte Antigens
DPC	: Dermal Papilla Cells
miRNA	: Micro Ribonucleic Acid
A-PRP	: Non activated Platelet-Rich Plasma
AA-PRP	: Autologous Activated Platelet-Rich Plasma
IL-10	: Interluekin-10
IFN	: Interferon
BMPs	: Bone Morphogenetic Proteins
IGF	: Insulin-Like Growth Factor
VEFG	: Vascular Endothelial Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
PEG	: Polyethylene Glycol

GDFs	: <i>Growth Differentiation Factors</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
CD4	: <i>Cluster Of Differentiation 4</i>
CD8	: <i>Cluster Of Differentiation 8</i>
MAPK/ERK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase / Extracellular-Signal-Regulated Kinase</i>
PI3K/AKT	: <i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
NF-kB	: <i>Nuclear Factor-Kappa Beta</i>
T reg	: <i>Regulatory T Cell</i>
TCR	: <i>T-cell Receptor</i>
MHC 1	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
RIPA	: <i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
NBF	: <i>Neutral Buffer Formalin</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

DAFTAR TABEL

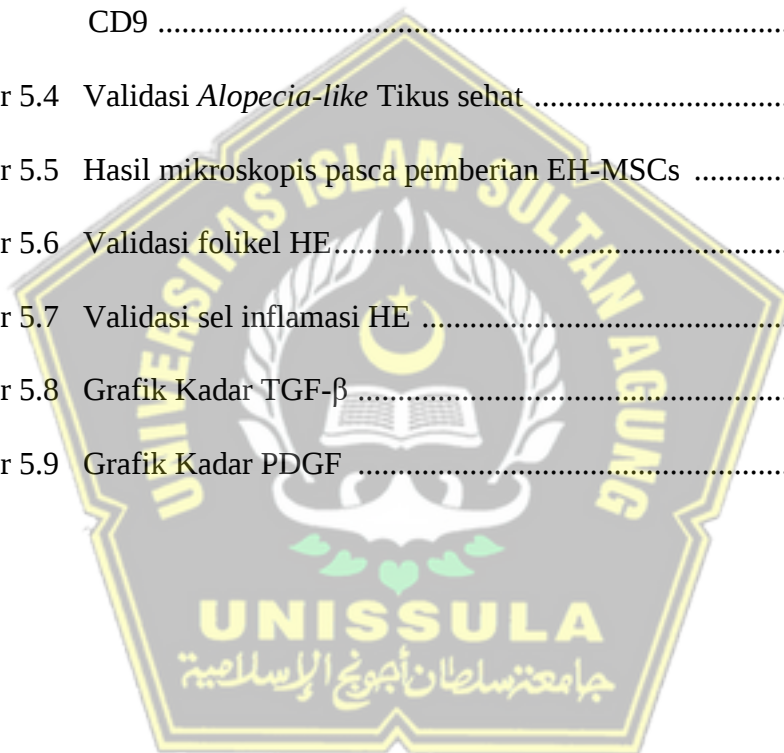
Tabel 1.1 Originalitas Penelitian	8
Tabel 5.1 Data Hasil Analisis Kadar TGF- β	61
Tabel 5.2 Perbedaan rerata kadar TGF- β antar dua kelompok dengan Uji <i>Post Hoc</i> LSD	62
Tabel 5.3 Data Hasil Analisis Kadar PDGF	64
Tabel 5.4 Perbedaan rerata kadar PDGF antar dua kelompok dengan Uji <i>Post Hoc</i> Tamhane	65



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Klasifikasi klinis varian <i>alopecia areata</i>	12
Gambar 2.2	Kerusakan hak kekebalan (<i>immune</i>) pada alopecia areata	14
Gambar 2.3	Penampakan infiltrat inflamasi " <i>Swarm of Bees</i> "	15
Gambar 2.4	Mekanisme jalur BMP/SMAD	16
Gambar 2.5	Jaringan interaktif jalur pensinyalan dalam sel induk folikel Rambut	16
Gambar 2.6	Diagram skema jalur pensinyalan TGF- β dan efek pengaturannya di berbagai jaringan	18
Gambar 2.7	Peristiwa morfogenesis folikel rambut	21
Gambar 2.8	Reseptor PDGF, ligan pengikatnya, dan jalur pensinyalan hilir dengan beragam efek seluler.....	22
Gambar 2.9	Konsentrasi faktor pertumbuhan dalam sampel plasma kaya trombosit	23
Gambar 2.10	Ekspresi PDGFR- α pada folikel rambut manusia dan sel DP manusia yang dikultur 3D	24
Gambar 2.11	Efek Eksosom MSC pada kulit	31
Gambar 3.1	Representasi skema untuk sumbu AR/miR-221/IGF1 yang mengatur jalur MAPK dan jalur PI3K/AKT	34
Gambar 3.2	Kerangka Teori.....	36
Gambar 3.3	Kerangka Konsep	37
Gambar 4.1	Skema Rancangan Penelitian	38
Gambar 4.2	Isolasi MSC dan Pembuatan <i>Exosome</i>	47

Gambar 4.3	Alur Penelitian.....	54
Gambar 5.1	Morfologi MSC	56
Gambar 5.2	Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna <i>alizarin red</i> dan (B) Adiposit pada pewarnaan <i>oil red o</i> (ditunjukkan dengan panah hitam, perbesaran 400x)	57
Gambar 5.3	Hasil Analisis Kadar Exosome menggunakan marker CD63 dan CD9	58
Gambar 5.4	Validasi <i>Alopecia-like</i> Tikus sehat	59
Gambar 5.5	Hasil mikroskopis pasca pemberian EH-MSCs	59
Gambar 5.6	Validasi folikel HE.....	60
Gambar 5.7	Validasi sel inflamasi HE	61
Gambar 5.8	Grafik Kadar TGF- β	63
Gambar 5.9	Grafik Kadar PDGF	66



ABSTRAK

Latar Belakang: Alopecia adalah kondisi kerontokan rambut yang dapat berdampak signifikan pada kualitas hidup dan kesejahteraan psikologis. Penelitian menunjukkan bahwa *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) dan *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) memiliki peran penting dalam regulasi siklus pertumbuhan rambut. Eksosom dari sel punca mesenkim (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*, EH-MSCs) diketahui mengandung molekul bioaktif yang dapat mendukung regenerasi jaringan dan mengatur siklus rambut. Namun, studi mengenai pengaruh EH-MSCs terhadap kadar TGF- β dan PDGF pada model alopecia masih terbatas.

Metode: Studi eksperimental *in vivo* secara *Randomized Post Test only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan model tikus wistar jantan yang diinduksi alopecia oleh fluconazole. Tikus dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, termasuk kelompok kontrol sehat, kontrol fluconazole, terapi minoxidil, serta dua dosis injeksi EH-MSCs (100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$). Analisis kadar TGF- β dan PDGF dilakukan menggunakan metode ELISA pada sampel kulit tikus. ANOVA satu arah dengan pengujian hubungan antar kelompok, dilakukan uji Post Hoc LSD diterapkan dalam pemeriksaan statistik perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil: Dibandingkan dengan kelompok kontrol, analisis kadar TGF- β pada K4 ($28,47 \pm 1,64$) dan K5 ($34,14 \pm 1,77$) tertinggi. Di sisi lain, kadar PDGF pada K4 ($7,42 \pm 0,09$) dan K5 ($8,68 \pm 0,40$) tertinggi. Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$ EH-MSC dapat meningkatkan kadar TGF- β dan PDGF secara signifikan.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) EH-MSC dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ terhadap peningkatan kadar TGF- β pada tikus model alopecia-like dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata Kunci: alopecia-like, TGF- β , PDGF dan EH-MSCs

ABSTRACT

Background: Alopecia is a hair loss condition that can have a significant impact on quality of life and psychological well-being. Research shows that Transforming Growth Factor- β (TGF- β) and Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) have an important role in the regulation of the hair growth cycle. Exosomes of mesenchymal stem cells (Exosomes Hypoxia Mesenchymal Stem Cells, EH-MSCs) are known to contain bioactive molecules that can support tissue regeneration and regulate the hair cycle. However, studies on the effect of EH-MSCs on TGF- β and PDGF levels in alopecia models are still limited.

Methods: Experimental study in vivo by Randomized Post Test only Control Group Design. This study used a model of male wistar mice induced alopecia by fluconazole. The mice were divided into five treatment groups, including a healthy control group, a fluconazole control, minoxidil therapy, as well as two injection doses of EH-MSCs (100 $\mu\text{g/kgBB}$ and 200 $\mu\text{g/kgBB}$). The analysis of TGF- β and PDGF levels was carried out using the ELISA method on rat skin samples. One-way ANOVA with the testing of relationships between groups, the Post Hoc LSD test was applied in examining the statistics of differences between treatment groups.

Results: Compared to the control group, the analysis of TGF- β levels in K4 (28.47 ± 1.64) and K5 (34.14 ± 1.77) was the highest. On the other hand, PDGF levels in K4 (7.42 ± 0.09) and K5 (8.68 ± 0.40) were the highest. Overall, the results of this study show that a dose of 200 $\mu\text{g/kgBB}$ EH-MSC can significantly increase TGF- β and PDGF levels.

Conclusion: There was an effect of administration (Exosome hypoxia mesenchymal stem cell) EH-MSC at doses of 100 $\mu\text{g/kgBB}$ and 200 $\mu\text{g/kgBB}$ on the increase in TGF- β levels in alopecia-like model mice compared to the control group.

Key Words: alopecia-like, TGF- β , PDGF and EH-MSCs

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alopecia adalah kondisi di penipisan rambut secara tiba-tiba dan berlebihan yang terjadi ketika siklus pertumbuhan rambut menjadi terganggu dan menyebabkan lebih banyak rambut masuk ke dalam fase telogen dan kemudian rontok.^{1,2} Kualitas dan penampilan rambut dapat menjadi indikator daya tarik dan seksualitas bagi banyak orang, dan kerontokan rambut yang terlihat dapat memiliki dampak negatif yang besar, terutama pada beberapa wanita, pada persepsi diri tentang karakteristik dan daya tarik feminin. Hal ini tampaknya merupakan hasil dari penekanan dan pentingnya penampilan fisik dan citra tubuh dalam lingkungan sosial. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa wanita dengan rambut rontok mengalami peningkatan rasa rendah diri, perasaan tidak menarik, penarikan diri dari sosial, stres emosional, dan kekhawatiran dibandingkan dengan wanita tanpa rambut rontok atau pria dengan rambut rontok¹⁰⁴, karena rambut merupakan komponen penting dari identitas dan citra diri, bahkan kerontokan rambut sebagian dapat menyebabkan berbagai kesulitan psikologis dan berdampak negatif pada kualitas hidup. Selain itu, jika dampak psikologis negatif tidak ditangani tepat waktu, kondisi penyakit dapat semakin memburuk.⁷⁹ Meskipun tidak mengancam jiwa, gangguan yang terlihat dapat secara langsung memengaruhi cara berpikir tentang diri mereka sendiri dan orang lain serta berdampak psikologis yang signifikan pada kesejahteraan mental.⁷⁹ Untuk mengetahui

komorbiditas psikologis yang terkait, maka dari itu dapat direncanakan intervensi tepat waktu untuk meminimalkannya dan memaksimalkan hasil pengobatan.⁷⁹

Alopecia areata (AA) adalah alopecia non-jaringan parut yang umum dan dimediasi oleh kekebalan tubuh dan dapat dikaitkan dengan konsekuensi psikologis yang parah.⁶⁵ Dalam penelitian sebelumnya, di antara 23% peserta yang mengalami alopecia areata, penyakit ini disebabkan oleh stres psikologis pada hampir dua kali lebih banyak pasien dibandingkan dengan mereka yang tidak stres.¹⁰⁰ Pasien alopecia areata berisiko mengalami depresi dan kecemasan, atopi, vitiligo, penyakit tiroid, dan kondisi autoimun lainnya.⁹⁴ Bahkan 47% pasien kemoterapi merasakan trauma pada alopecia.⁹ Sebuah studi yang dilakukan oleh Nihal Altunisik, *et al* melaporkan bahwa 51% pasien alopecia areata pediatrik memenuhi kriteria gangguan kecemasan.¹⁰¹ Prevalensi gangguan kejiwaan seumur hidup dilaporkan sebesar 66%–74% pada pasien alopecia areata, dengan prevalensi seumur hidup sebesar 38%–39% prevalensi depresi dan prevalensi gangguan kecemasan umum sebesar 39%–62% gangguan penyesuaian juga umum ditemukan pada alopecia areata.¹⁰² Alopecia areata menyebabkan menurunnya kualitas hidup *Quality of Life* (QoL) pada setengah dari penderitanya dan dikaitkan dengan sekitar 70% prevalensi gangguan kejiwaan seumur hidup, yang paling umum adalah depresi, kecemasan, dan gangguan penyesuaian yang dapat berujung pada masalah sosial, pekerjaan, dan pribadi.⁹⁴ Gangguan kualitas hidup terdeteksi pada 77,6% peserta dewasa, 65,9% dari mereka memiliki tanda-tanda depresi atau

kecemasan, dan 12,8% berisiko bunuh diri.¹⁰² Demikian pula hasil penelitian Özge aşkın, *et al* memberikan kesimpulan anak-anak dengan alopecia areata juga ditemukan memiliki lebih banyak gejala kecemasan dan depresi, dan tingkat harga diri yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol sebanyak 61% peserta alopecia areata mengalami depresi.¹⁰³ Gangguan kualitas hidup terdeteksi pada 76,7% peserta anak-anak, dan 6,3% dari mereka menunjukkan tanda-tanda depresi dengan Skala Penilaian Diri Depresi *Birleson*.¹⁰²

Penyebab pasti dan patogenesis alopecia sampai sekarang belum diketahui dengan jelas. Berbagai penelitian memperlihatkan genetik dan lingkungan sebagai faktor predisposisi.⁷² Berdasarkan studi asosiasi genom menunjukkan kecenderungan genetik terhadap alopecia areata. Gangguan lingkungan, seperti infeksi virus, trauma, atau stres psikososial, juga diduga mungkin berkontribusi terhadap perkembangan penyakit alopecia areata.⁹⁴ Banyak bukti menunjukkan bahwa alopecia areata merupakan penyakit autoimun, bukti tersebut antara lain; (1) didapatkan peningkatan penyakit autoimun lain pada pasien alopecia areata (2) peningkatan autoantibodi spesifik organ pada pasien alopecia areata (3) karakteristik patologi berupa infiltrasi limfosit-T pada *hair bulb*, (4) pada model hewan alopecia areata, menurunnya sel-T CD4 dan CD8 berakibat pertumbuhan kembali rambut, dan (5) alopecia areata memiliki asosiasi genetik dengan beberapa penyakit autoimun lain, terutama dengan gen *major histocompatibility complex* (MHC). Antigen yang berhubungan dengan folikel rambut mengaktifkan respons imun

yang tidak sesuai, menyerang folikel rambut pada fase anagen, menyebabkan gangguan pertumbuhan. Pada etiologi autoimun, wilayah HLA (*human leukocyte antigens*), yang mengkode molekul MHC pada manusia, awalnya diidentifikasi sebagai kontributor utama terhadap fenotipe alopecia areata.⁹⁴

Prinsip utama pengobatan alopecia areata yakni menghambat atau mengubah respons imunologi dengan memodulasi proses peradangan yang terjadi di sekitar folikel rambut. Beberapa pilihan pengobatan pada alopecia areata diantaranya kortikosteroid topikal, injeksi, kortikosteroid intralesi, imunomodulator, hingga terapi sel punca, tetapi terapi yang ada belum memberikan hasil yang maksimal serta angka remisi spontan juga masih tinggi.⁷⁵

Minoxidil merupakan salah satu terapi yang banyak digunakan untuk terapi alopecia. Minoxidil bekerja sebagai vasodilatator untuk meningkatkan aliran darah ke area yang terpapar. Meskipun diketahui memiliki efek untuk dapat meningkatkan pertumbuhan rambut, pemakaian minoxidil dapat menimbulkan beberapa efek seperti alergi dan iritasi. Selain itu Minoxidil tidak dapat menurunkan inflamasi yang menjadi sumber permasalahan dari alopecia sehingga akan terjadi *reccurence* dan resistensi.¹⁰ Beberapa efek sampingnya yaitu hipertrikosis, hilangnya libido, disfungsi ereksi, volume ejakulasi, serta ginekomastia. Pengobatan yang lainnya yang terbaru adalah Transplantasi rambut (*Hair transplantation*) merupakan prosedur medis yang dirancang untuk mengatasi kebotakan atau penipisan rambut dengan memindahkan folikel rambut dari area yang memiliki rambut sehat ke area yang mengalami

kerontokan atau kebotakan. Prosedur ini sering digunakan untuk mengobati kondisi seperti *androgenetic alopecia* dan dalam beberapa kasus alopecia lainnya. Hasil restorasi rambut bersifat permanen namun transplantasi rambut memiliki efek samping meliputi reaksi buruk terhadap anestesi, pendarahan, nyeri, edema, nyeri intraoperatif atau pascaoperasi.⁷¹

Penelitian terhadap sel punca masih terus di kembangkan termasuk pengembangan dalam pengobatan alopecia, yaitu *Exosome hypoxia mesenchymal* (EH-MSCs) merupakan *microviscle* diproduksi oleh MSC pada medium kultur dalam kondisi hipoksia.³ Eksosom MSC mengandung berbagai macam protein, seperti faktor pertumbuhan dan sitokin, yang dapat merangsang pertumbuhan rambut dan memodulasi siklus pertumbuhan rambut.^{11,12} Selain itu, eksosom MSC juga mengandung miRNA yang dapat mempengaruhi kadar khususnya TGF- β dan PDGF yang terlibat dalam regulasi siklus rambut.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa *Exosome hypoxia* MSC mampu meregulasi TGF- β dan PDGF serta mempercepat penyembuhan luka dan perbaikan jaringan baik *in vitro* maupun *in vivo*.^{13,14} Namun demikian, penelitian mengenai pengaruh *Exosome hypoxia* MSC terhadap TGF- β dan PDGF untuk alopecia masih sangat terbatas, sehingga perlu untuk dilakukan kajian.

TGF- β adalah sitokin multifungsi yang berperan dalam regulasi pertumbuhan, diferensiasi, dan apoptosis sel. Dalam folikel rambut, TGF- β memiliki kemampuan untuk menginduksi fase katagen, yaitu fase regresi dari siklus rambut, yang diikuti dengan kematian sel papilla dermal melalui

mekanisme apoptosis. Penelitian yang dilakukan oleh Hibino dan Nishiyama menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi TGF- β di folikel rambut berkontribusi pada transisi cepat dari fase anagen (pertumbuhan) ke fase katagen, yang menyebabkan kerontokan rambut yang berlebihan dan memicu alopecia.⁸⁰

PDGF berperan sebagai faktor pertumbuhan yang mendorong proliferasi dan migrasi berbagai tipe sel, termasuk fibroblas dan sel otot polos, yang mendukung perbaikan jaringan dan angiogenesis. PDGF juga memiliki peran penting dalam mendukung pertumbuhan rambut dengan cara merangsang pembentukan pembuluh darah di sekitar folikel rambut dan mendukung pertumbuhan sel dermal papilla. Penurunan aktivitas PDGF telah dikaitkan dengan berkurangnya vaskularisasi di sekitar folikel rambut, yang berpotensi menyebabkan kondisi seperti alopecia. Penelitian yang dilakukan oleh Philp *et al* menunjukkan bahwa PDGF-BB merangsang pertumbuhan sel dermal papilla folikel rambut melalui jalur sinyal Akt, yang sangat penting untuk regenerasi folikel rambut dan mencegah kerontokan rambut.⁸¹

Studi ini bermaksud guna membuktikan dampak *Exosome hypoxia* MSC dalam sediaan injeksi pada kadar TGF- β dan PDGF kulit tikus model *alopecia-like* yang diinduksi fluconazole secara *in vivo*.

1.2.Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs) terhadap kadar TGF- β dan PDGF pada Tikus model *Alopecia like* yang diinduksi Fluconazole?

1.3.Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Tujuan umum yang ingin dicapai penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian *Exosome hypoxia* MSC terhadap kadar TGF- β dan PDGF yang diinduksi fluconazole pada Tikus Jantan Galur Wistar.

1.3.2. Tujuan khusus

1.3.2.1. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan kadar TGF- β antar kelompok *Exosome hypoxia* MSC 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ dengan kelompok kontrol pada Tikus model *Alopecia Like* yang diinduksi Fluconazole.

1.3.2.2. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan kadar PDGF antar kelompok *Exosome hypoxia* MSC 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ dengan kelompok kontrol pada Tikus model *Alopecia Like* yang diinduksi Fluconazole.

1.4.Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Variabel Bebas	Hasil
1.	Yanqiao Li <i>et al</i> , 2022 ¹⁶	Sekresi Eksosom dari Sel Punca Adiposa (ADSC-Exos) sebagai Terapi Alternatif Alopecia yang Dimediasi Imun	Pemberian sekresi eksosom dari sel punca adiposa	Terapi ADSC-Exos meningkatkan pertumbuhan rambut dengan regulasi jalur pensinyalan miR-22, Wnt / β -catenin, dan TNF- α pada alopecia yang dimediasi imun.
2.	Dong Ho Bak <i>et al</i> , 2018 ¹⁷	Peran Ekspresi Faktor Pertumbuhan oleh Sel Punca Mesenkimal Darah Tali Pusat Manusia yang Direkayasa (hUCB-MSC) Dalam Pertumbuhan Rambut	Pemberian sel punca mesenkimal darah tali pusat manusia yang direkayasa	hUCB-MSCs meningkatkan protein untuk induksi rambut secara in vitro seperti IGFBP-1 dan VEGF
3.	Jia Yi Ding <i>et al</i> , 2020 ¹⁵	Vesikel ekstraseluler yang berasal dari sel punca mesenkimal dalam penyembuhan luka kulit: peran, peluang, dan tantangan	Pemberian eksosom yang berasal dari <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSC)	Eksosom yang berasal dari MSC menunjukkan potensi besar dalam mempercepat penyembuhan luka, meregenerasi pembuluh darah, saraf, dan folikel rambut.
4.	Liang Y <i>et al</i> , 2023 ³	Eksosom Berasal Sel Stroma Mesenkim Adiposa yang Membawa MiR-122-5p Melawan	Pemberian miR-122-5p dalam eksosom	miR-122-5p, yang sangat diperkaya dengan ADSC-Exos, meningkatkan regulasi ekspresi β -catenin

		Efek Penghambatan Dihidrotestosteron pada Folikel Rambut dengan Menargetkan TGF- β Jalur Sinyal 1/SMAD3		dan versikan dengan menargetkan SMAD3 in vivo dan in vitro.
5.	Tomita Y <i>et al</i> , 2006 ⁶³	Isoform PDGF menginduksi dan mempertahankan fase anagen folikel rambut murine	Pemberian injeksi PDGF-AA dan -BB	PDGF-AA dan - BB terlibat dalam induksi dan pemeliharaan fase anagen dalam siklus rambut tikus
6.	Pietro Gentile, Simon e Garcovich, 2020 ¹⁵	<i>Autologous Activated Platelet-Rich Plasma (AA-PRP)</i> dan <i>Non activated (A-PRP)</i> pada Pertumbuhan Rambut: evaluasi retrospektif, <i>blinded</i> , acak pada Alopecia Androgenik	Pemberian AA-PRP dan A-PRP	Pemberian AA- PRP menyebabkan peningkatan <i>hair density</i> sebesar $31 \pm 2\%$

Berdasarkan kajian beberapa penelitian diatas, ditemukan bahwa telah dilakukan penelitian mengenai terapi alopecia, namun demikian belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian *Exosome hypoxia* MSC (EH-
MSCs) terhadap kadar TGF- β dan PDGF pada tikus model *alopecia-like* yang diinduksi fluconazole sehingga penelitian ini layak untuk dilakukan.

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Manfaat yang ingin didapat dari penelitian ini adalah memberikan bukti ilmiah peran *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* terhadap kadar TGF- β dan PDGF pada Tikus model *Alopecia like* yang diinduksi Fluconazole.

1.5.2. Manfaat Praktis

1.5.2.1. Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk alternatif terapi lanjutan

1.5.2.2. Hasil penelitian ini dapat menjadi tambahan landasan teori bagi penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan peran *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* terhadap kadar TGF- β dan PDGF pada Tikus model *Alopecia like* yang diinduksi Fluconazole

1.5.2.3. Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan yang berguna bagi masyarakat mengenai kegunaan *Exosome hypoxia MSC* untuk perlindungan kulit.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1.Alopecia

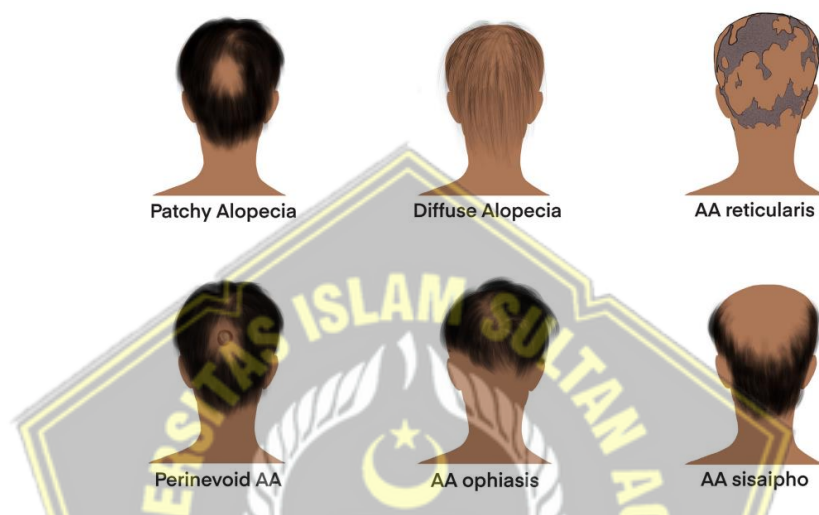
2.1.1. Definisi

Alopecia adalah kondisi kerontokan rambut yang *reversible* dan umum terjadi. Biasanya, kondisi ini ditandai dengan area kerontokan total rambut di kulit kepala dan bagian tubuh lainnya, yang dalam beberapa kasus dapat menyebabkan kerontokan seluruh rambut tubuh. Laki-laki dan perempuan memiliki risiko yang sama untuk mengalami kondisi ini, namun beberapa data menunjukkan bahwa laki-laki lebih mungkin mendapatkan diagnosis dini dibandingkan perempuan pada masa remaja, terutama jika ada keterlibatan kuku dan penyakit autoimun. Prevalensi kondisi ini berkisar antara 0,1% hingga 0,2% secara global.

2.1.2. Alopecia areata (AA)

Alopecia areata adalah jenis kerontokan rambut atau alopecia yang umum terjadi pada manusia, penyakit ini merupakan penyakit autoimun dengan perjalanan penyakit yang bervariasi, biasanya kambuh atau remisi, yang dapat berlangsung lama, terutama jika kerontokan rambut sangat parah. Alopecia areata adalah alopecia tanpa jaringan parut yang paling sering terjadi kedua, setelah alopecia pola pria dan wanita. Pola klinis kerontokan rambut pada alopecia areata biasanya sangat berbeda. Pola yang paling umum adalah lesi botak kecil berbentuk lingkaran atau tidak merata

(alopecia areata tidak merata), biasanya di kulit kepala, yang dapat berkembang menjadi kerontokan total hanya pada rambut kulit kepala (alopecia totalis), dan kerontokan total semua rambut tubuh (alopecia universalis).⁶⁶



Gambar 2.1. Klasifikasi klinis varian alopecia areata⁹⁵

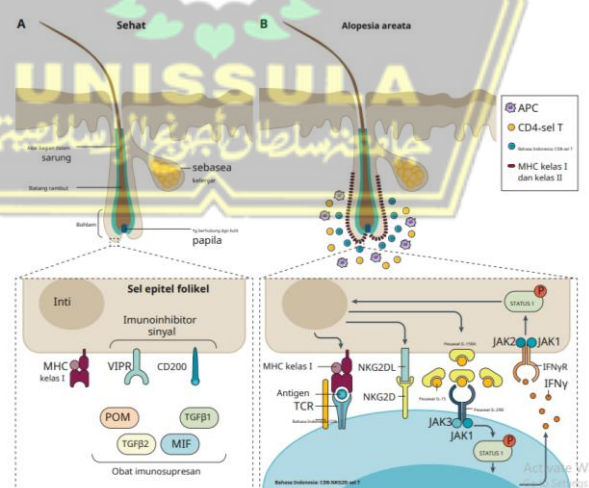
Patchy Alopecia, melibatkan kerontokan rambut yang terlokalisasi pada satu atau beberapa bercak di kepala. *Diffuse alopecia* melibatkan kerontokan rambut di seluruh kepala. *Alopecia areata reticularis* melibatkan kerontokan rambut yang berpola retikularis tanpa bercak botak yang jelas. *Perinevoid Alopecia areata* adalah kerontokan rambut yang tidak merata dengan nevus melanositik yang ditemukan di bercak yang tidak berambut. *Alopecia areata ophiasis* adalah kerontokan rambut yang terlokalisasi di bagian belakang dan samping kulit kepala. Kerontokan rambut *Alopecia areata sisaipho* tidak mengenai bagian belakang dan samping kulit kepala, hal ini dianggap sebagai kebalikan dari *Alopecia*

areata ophiasis, dan sebenarnya adalah ophiasis yang dikatakan terbalik.⁹⁵

Secara klinis, alopecia ditandai dengan area sirkular atau oval yang mengalami kerontokan *non-scarring*, seringkali diikuti oleh periode remisi spontan dan eksaserbasi. Area yang terkena dapat berwarna merah muda dengan rambut berbentuk *exclamation point* di tepinya. Rambut ini pendek dan rusak, dengan porsi distal yang lebih lebar daripada bagian proksimalnya. Kulit yang terkena menjadi lembut dan hampir tidak memiliki rambut. Area yang sering terkena termasuk rambut tubuh, alis, bulu mata, janggut, ketiak, pubis, dan seluruh tubuh. Kulit kepala adalah area yang paling sering terkena, mencapai 90% kasus. Sebelum kerontokan rambut, beberapa orang mungkin merasakan gatal atau sensasi terbakar, meskipun ini tidak umum. Abnormalitas kuku juga dapat terjadi, yang dapat kembali normal atau bertahan setelah restorasi rambut.

Hak istimewa kekebalan folikel rambut dapat dicapai melalui beberapa strategi termasuk: penurunan regulasi MHC kelas I dan β 2mikroglobulin, yang biasanya merangsang sel pembunuh alami (NK); produksi imunosupresan lokal; ekspresi sinyal imunoinhibitor (misalnya, CD200; juga dikenal sebagai glikoprotein membran OX2); dan represi fungsi sel penyaji antigen intrafolikular (APC), sel NK perifolikular, dan sel mast karena peningkatan kadar faktor penghambat migrasi makrofag (MIF). Peptida intestinal vasoaktif (VIP), yang dilepaskan oleh serabut saraf sensorik perifolikular, juga diyakini sebagai neuropeptida imunoinhibitor yang mungkin berperan dalam hak istimewa imun. Folikel rambut anagen

akhir pada pasien dengan alopecia areata memiliki infiltrasi perifolikular APC, sel CD4⁺ dan CD8⁺ Sel T, dan ekspresi abnormal molekul MHC kelas I dan kelas II. CD8⁺ Sel T juga menyusup ke dalam selubung akar folikel rambut. Molekul yang terlibat dalam kaskade ko-stimulasi limfosit terlibat dalam patogenesis alopecia areata dan menyediakan target untuk intervensi terapeutik. Tidak ada sel inflamasi yang ditemukan di sekitar folikel normal pada fase anagen akhir. IFN γ , interferon- γ ; IFN γ R, reseptor IFN γ ; IL-2RB, subunit- β reseptor IL-2; IL-15RA, subunit- α reseptor IL-15; JAK, kinase Janus; NKG2D, reseptor sel NK D; NKG2DL, ligan NKG2D; P, terfosforilasi; POMC, pro-opiomelanokortin; STAT1, transduser sinyal dan activator transkripsi 1; TCR, reseptor sel T; TGF β , transforming growth factor- β ; VIPR, reseptor VIP.⁹⁴



Gambar 2.2. Kerusakan hak kekebalan (*immune*) pada alopecia areata.⁹⁴

Pada folikel rambut alopecia areata, diyakini bahwa peningkatan aktivitas MHC kelas I dan MHC kelas II dikaitkan dengan perekrutan leukosit ke umbi rambut. Gambar diatas menggambarkan runtuhnya hak istimewa kekebalan folikel rambut, yang menyebabkan segerombolan sel $CD8^+$ Sel T, $CD4^+$ Sel T, sel penyaji antigen, dan sel mast yang mengelilingi folikel. Sel imunoinflamasi ini menyebabkan gangguan siklus pertumbuhan rambut dan kerusakan folikel.⁹⁵



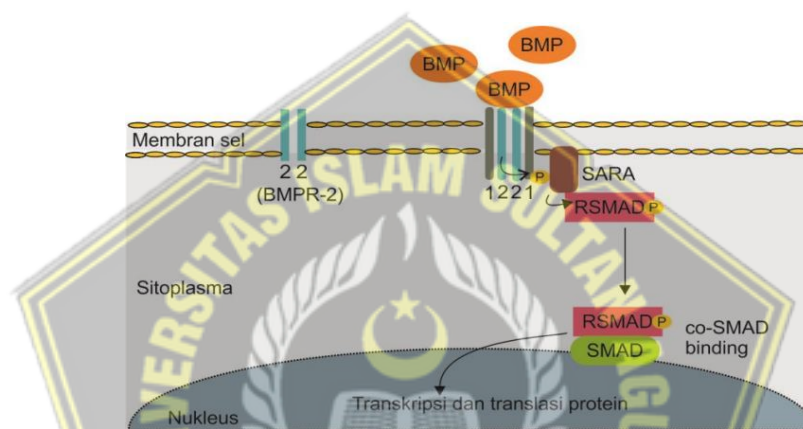
Gambar 2.3. Penampakan infiltrat inflamasi "Swarm of Bees"⁹⁵

2.2. Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

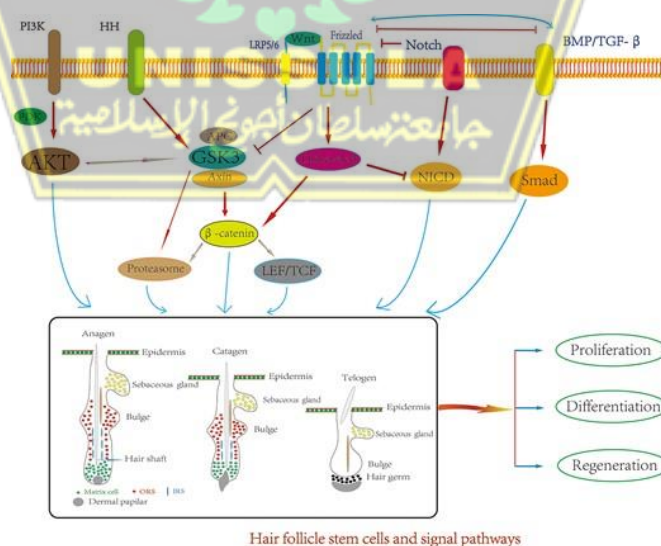
2.2.1. Definisi

Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) adalah sekelompok protein yang memainkan peran penting dalam regulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel.¹⁸ TGF- β terdiri dari tiga isoform utama: TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3. Isoform-isoform ini memiliki ukuran molekul sekitar 25 kDa. Gen yang mentranskripsikan TGF- β adalah TGFB1, TGFB2, dan TGFB3

masing-masing untuk TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3. TGF- β merupakan bagian dari keluarga besar TGF- β *superfamily*, yang juga mencakup protein lain seperti *activins*, *inhibins*, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), dan *growth differentiation factors* (GDFs).^{18,19} Protein-protein ini terlibat dalam berbagai proses biologis, termasuk embriogenesis, homeostasis jaringan, dan respon imun.²⁰



Gambar 2.4. Mekanisme jalur BMP/SMAD⁹⁸



Gambar 2.5. Jaringan interaktif jalur pensinyalan dalam sel induk folikel rambut.⁶¹

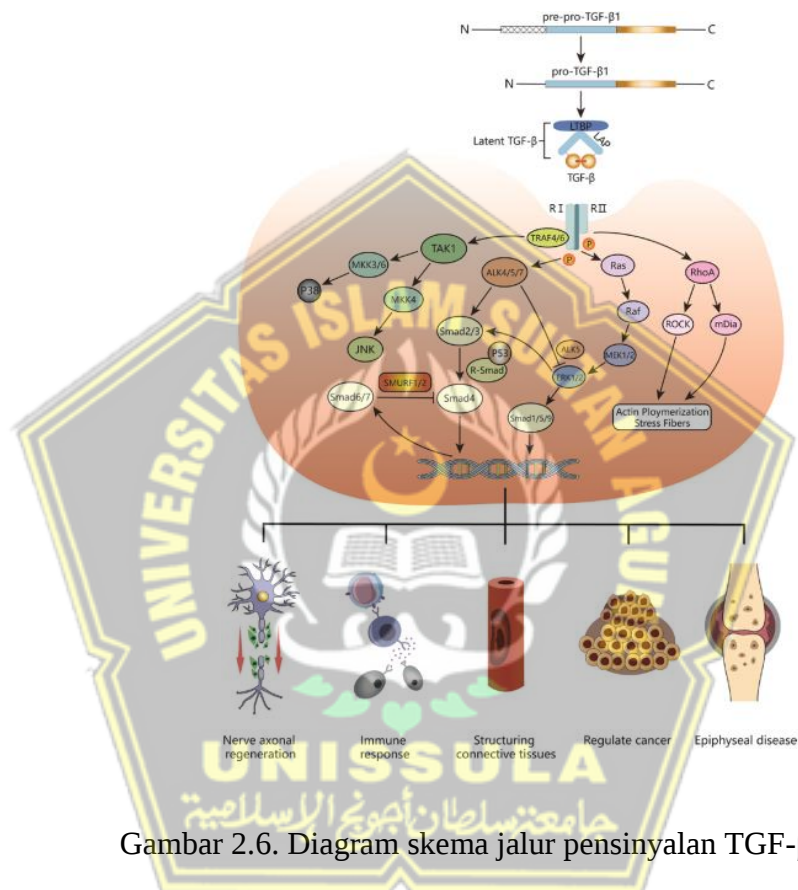
2.2.2. Peran TGF- β pada Alopecia

Jalur *cascade* protein TGF- β memainkan peran penting dalam berbagai proses perkembangan alopecia, yang merupakan kondisi kehilangan rambut. TGF- β , setelah diaktifkan, mengikat reseptor TGF- β tipe II pada permukaan sel, yang kemudian merekrut dan memfosforilasi reseptor TGF- β tipe I. Aktivasi reseptor tipe I ini memulai fosforilasi protein Smad2 dan Smad3. Smad2/3 yang terfosforilasi kemudian berikatan dengan Smad4, dan kompleks ini berpindah ke nukleus untuk mengatur ekspresi gen target. Salah satu peran utama aktivasi jalur TGF- β dalam folikel rambut adalah menginduksi fase katagen, atau fase regresi dalam siklus rambut.²¹ TGF- β meningkatkan ekspresi gen-gen yang terkait dengan apoptosis sel-sel matriks folikel rambut, yang menghentikan proliferasi sel dan membawa folikel ke fase katagen.^{22,23} Selain itu, TGF- β juga dapat menghambat proliferasi sel-sel dermal papilla, yang sangat penting untuk pemeliharaan dan regenerasi folikel rambut. Ketika aktivitas sel-sel dermal papilla menurun, miniaturisasi folikel rambut dapat lebih cepat terjadi yang menjadi ciri khas alopecia.²³

2.2.3. Faktor yang Mempengaruhi Produksi TGF- β

Produksi TGF- β pada alopecia dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk genetik, hormon, dan lingkungan, yang semuanya berkontribusi pada regulasi kompleks dari jalur TGF- β dalam folikel rambut. Faktor genetik memainkan peran penting, di mana variasi genetik tertentu dapat meningkatkan ekspresi TGF- β atau sensitivitas folikel rambut terhadap

TGF- β . Misalnya, gen yang mengkode protein terkait dengan jalur TGF- β , seperti SMAD4 atau TGFBR1/2, dapat memiliki varian yang memodulasi aktivitas jalur ini, berkontribusi pada predisposisi individu terhadap alopecia.²⁶



Gambar 2.6. Diagram skema jalur pensinyalan TGF- β dan efek pengaturannya di berbagai jaringan.²⁰

Faktor lingkungan seperti stres, polusi, dan diet juga dapat mempengaruhi produksi TGF- β . Stres kronis misalnya, dapat meningkatkan kadar hormon stres seperti kortisol, yang telah terbukti mempengaruhi ekspresi TGF- β di berbagai jaringan, termasuk kulit kepala. Polusi lingkungan dan toksin juga dapat merusak sel-sel folikel rambut dan meningkatkan produksi TGF- β sebagai respons terhadap kerusakan

tersebut.²⁷ Diet yang tidak seimbang, kekurangan nutrisi penting seperti vitamin D dan biotin, juga dapat mengganggu keseimbangan normal faktor pertumbuhan dan hormon, termasuk TGF- β .²⁸⁻³⁰

Selain itu, proses peradangan lokal di kulit kepala dapat meningkatkan produksi TGF- β . Peradangan kronis sering dikaitkan dengan peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi dan faktor pertumbuhan, termasuk TGF- β , yang dapat mengganggu siklus normal pertumbuhan rambut dan berkontribusi pada perkembangan alopecia. Akumulasi faktor-faktor ini menciptakan lingkungan yang kondusif untuk peningkatan produksi TGF- β , yang secara langsung mempengaruhi kesehatan dan siklus folikel rambut, serta berkontribusi pada kerontokan rambut yang progresif.

2.3. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

2.3.1. Definisi

Platelet-Derived Growth Factor adalah sekelompok faktor pertumbuhan protein yang memainkan peran penting dalam berbagai proses biologis, termasuk proliferasi sel, penyembuhan luka, dan angiogenesis.³¹

PDGF terdiri dari empat polipeptida yang berbeda, yaitu PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, dan PDGF-D.³²⁻³⁶ Polipeptida ini dapat berikatan membentuk dimer yang aktif secara biologis, baik sebagai homodimer (seperti PDGF-AA, PDGF-BB) maupun heterodimer (seperti PDGF-AB).

Setiap dimer memiliki spesifisitas dan fungsi biologis yang unik. Ukuran molekul dari PDGF bervariasi tergantung pada jenisnya; PDGF-A

dan PDGF-B memiliki berat molekul sekitar 14-17 kDa per monomer, sementara PDGF-C dan PDGF-D lebih besar, dengan berat molekul sekitar 23-24 kDa per monomer.

PDGF-A dan PDGF-B terlibat dalam proliferasi dan migrasi sel dermal papilla, memainkan peran penting dalam pertumbuhan dan regenerasi rambut. PDGF-C dan PDGF-D, meskipun masih belum banyak dipahami dibandingkan PDGF-A dan PDGF-B, protein ini juga berperan dalam proses angiogenesis dan penyembuhan luka.³²⁻³⁶

2.3.2. Peran PDGF pada Alopecia

Platelet-Derived Growth Factor A (PDGF-A) memainkan peran penting dalam proliferasi sel dan pertumbuhan rambut, yang memiliki implikasi signifikan dalam pengobatan alopecia.³⁷

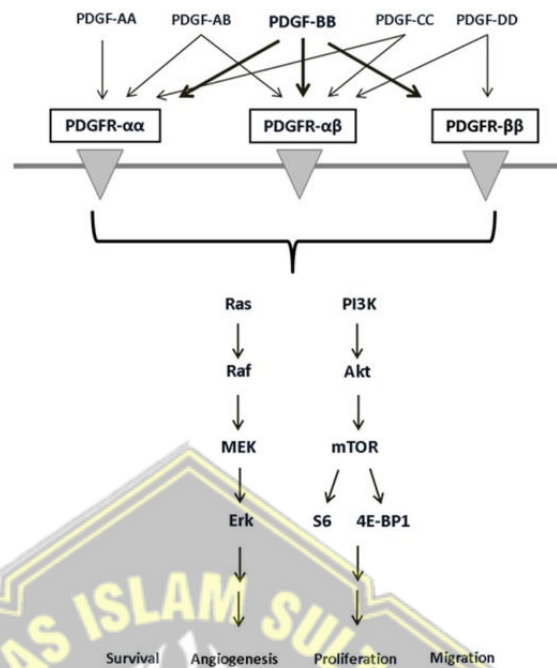
PDGF-AA dan reseptor faktor pertumbuhan turunan trombosit (PDGFR)-alpha diekspresikan dalam folikel rambut manusia selama perkembangan janin, dan peran PDGF-AA dalam perkembangan folikel rambut diduga karena fakta bahwa pembentukan rambut terganggu.⁶³ PDGF-AA diproduksi oleh keratinosit epidermis plakoda dan meningkatkan pembentukan kondensat dermal (agregat DPC) pada awal morfogenesis folikel. Peran penting lain dari PDGF-AA adalah menginduksi dan mempertahankan fase anagen dari siklus rambut. Pada fase anagen, HDPC menghasilkan serangkaian faktor pertumbuhan untuk mengendalikan pertumbuhan rambut dengan berinteraksi dengan sel-sel di sekitarnya,

seperti sel-sel matriks rambut. Aktivitas fisiologis ini mengonsumsi energi seluler yang substansial dan, dengan demikian, fungsi mitokondria kemungkinan berkorelasi dengan aktivitas yang membutuhkan energi ini yang dipicu oleh PDGF-AA.³⁹



Gambar 2.7. Peristiwa morfogenesis folikel rambut.³⁸

Jalur PI3K/AKT berperan dalam mempromosikan kelangsungan hidup dan proliferasi sel. Ketika PI3K diaktifkan, ia mengonversi PIP2 menjadi PIP3, yang kemudian mengaktifkan AKT. AKT yang aktif memberikan sinyal untuk pertumbuhan sel, proliferasi, dan kelangsungan hidup dengan menghambat jalur-jalur pro-apoptosis. Dalam folikel rambut, aktivasi jalur PI3K/AKT oleh PDGF-A memastikan bahwa sel-sel dermal papilla tetap aktif dan mampu mendukung fase anagen, fase pertumbuhan dari siklus rambut.³⁹



Gambar 2.8. Reseptor PDGF, ligan pengikatnya, dan jalur pensinyalan hilir dengan beragam efek seluler.⁶⁹

Pengikatan reseptor/ligan PDGF dapat mengaktifkan jalur PI3K/Akt dan MAPK dan memengaruhi kelangsungan hidup sel, angiogenesis, proliferasi, dan migrasi. Selain itu, jalur MAPK/ERK berperan dalam regulasi pembelahan dan diferensiasi sel. Aktivasi jalur ini dimulai dengan pengaktifan Ras, yang kemudian mengaktifkan serangkaian kinase termasuk RAF, MEK, dan akhirnya ERK. ERK yang terfosforilasi berpindah ke nukleus dan mengatur ekspresi gen-gen yang terkait dengan proliferasi dan diferensiasi sel. Dalam konteks folikel rambut, aktivasi jalur MAPK/ERK oleh PDGF-A mendorong sel-sel dermal papilla untuk mendukung pertumbuhan dan regenerasi rambut.

Platelet Rich Plasma (PRP) plasma kaya trombosit sebelumnya telah digunakan untuk mengobati berbagai jenis alopecia termasuk alopecia areata.¹⁰⁷ PRP adalah plasma autolog terkonsentrasi pada trombosit yang digunakan untuk merangsang pertumbuhan rambut dan regenerasi folikel. Trombosit mengeluarkan lebih dari 20 faktor pertumbuhan dan sitokin penting, termasuk faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), faktor pertumbuhan transformasi (TGF).⁹⁹



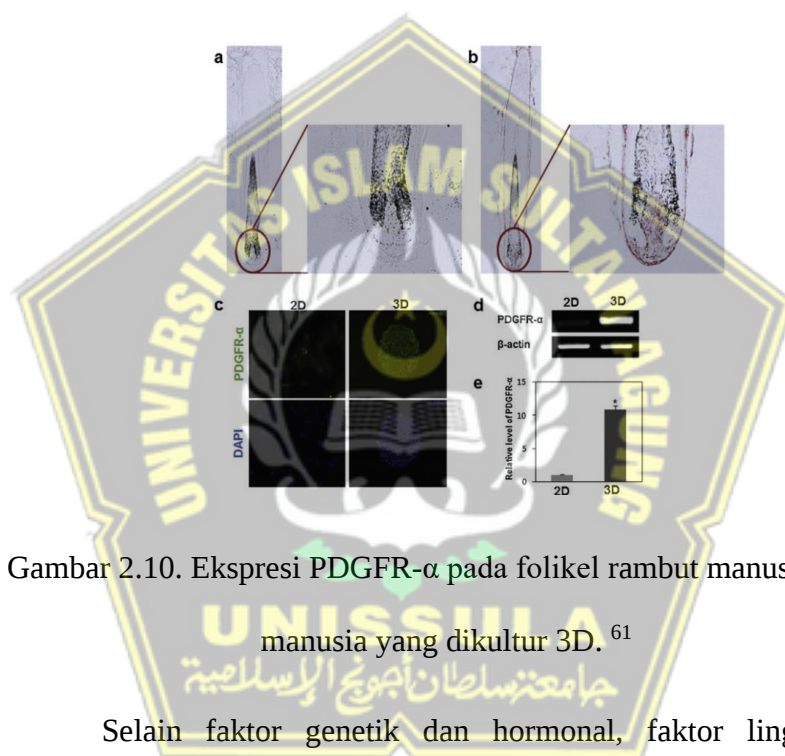
Gambar 2.9. Konsentrasi faktor pertumbuhan dalam sampel plasma kaya trombosit.⁶⁴

Berdasarkan diagram diatas didapatkan bahwa di antara faktor pertumbuhan ini, PDGF dan TGF-β menunjukkan konsentrasi tertinggi.⁶⁴

2.3.3. Faktor yang mempengaruhi kadar PDGF

Produksi *Platelet-Derived Growth Factor A* (PDGF-A) pada kulit dipengaruhi oleh berbagai faktor yang kompleks, termasuk faktor genetik, hormonal, dan lingkungan. Secara genetik, variasi dalam gen yang mengkode PDGF-A atau reseptornya dapat menyebabkan perbedaan tingkat

ekspresi PDGF-A di antara individu. Hormon seperti *insulin-like growth factor* (IGF) dan androgen, termasuk testosteron dan dihidrotestosteron (DHT), memainkan peran penting dengan meningkatkan produksi PDGF-A.⁴⁰ Androgen ini terutama berpengaruh dalam regenerasi dan siklus pertumbuhan rambut, di mana mereka meningkatkan ekspresi PDGF-A di folikel rambut.



Gambar 2.10. Ekspresi PDGFR- α pada folikel rambut manusia dan sel DP manusia yang dikultur 3D.⁶¹

Selain faktor genetik dan hormonal, faktor lingkungan juga memainkan peran signifikan dalam produksi PDGF-A. Paparan sinar ultraviolet (UV) dari matahari dapat merangsang keratinosit untuk menghasilkan PDGF-A sebagai respons terhadap kerusakan sel yang disebabkan oleh radiasi UV. Polusi dan toksin lingkungan lainnya memicu stres oksidatif dan kerusakan sel, yang pada gilirannya meningkatkan produksi PDGF-A sebagai bagian dari mekanisme perbaikan tubuh. Stres, baik fisik maupun psikologis, juga mempengaruhi produksi PDGF-A.

Cedera fisik pada kulit, seperti luka, meningkatkan produksi PDGF-A untuk mendukung penyembuhan, sementara stres psikologis, melalui peningkatan hormon kortisol, dapat merangsang ekspresi PDGF-A.^{41–43}

Nutrisi dan kondisi kesehatan juga berperan penting dalam regulasi PDGF-A. Vitamin D, vitamin C, dan zinc merupakan nutrisi penting yang mendukung produksi PDGF-A, dan kekurangan nutrisi ini dapat menghambat produksi PDGF-A dan mempengaruhi kesehatan kulit.^{44,45} Selain itu, kondisi inflamasi, baik akut maupun kronis, meningkatkan produksi PDGF-A melalui pelepasan oleh sel imun dan fibroblas untuk memperbaiki jaringan yang rusak. Akhirnya, proses penuaan alami menyebabkan penurunan produksi PDGF-A, yang berkontribusi pada berkurangnya kemampuan regenerasi kulit dan penyembuhan luka. Memahami semua faktor ini adalah kunci dalam mengembangkan terapi yang dapat meningkatkan produksi PDGF-A untuk memperbaiki kesehatan kulit dan mengatasi kondisi seperti alopecia.⁴⁶

2.4.Hipoksia

Hipoksia merupakan kondisi dimana tidak terdapat pasokan oksigen ke jaringan, dampak negatif dari berbagai tipe sel yang terpapar hipoksia yang berkepanjangan dapat menyebabkan apoptosis sel. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa lingkungan hipoksia dapat mengakibatkan adhesi, proliferasi, dan pembaharuan dari MSCs. Lingkungan hipoksia menyebabkan sintesis molekul *Hypoxic Induce Factor* (HIF), yang membantu MSCs memproduksi lebih banyak sitokin.

2.5. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (EH-MSC)*

2.5.1. Definisi

Exosome dari *mesenchymal stem cell* (MSC) adalah vesikel ekstraseluler berukuran 30-150 nm yang berperan dalam komunikasi antar sel. Mereka memiliki marker permukaan spesifik seperti CD63, CD81, dan CD9, yang digunakan untuk identifikasi dan isolasi. *Exosome* dibagi berdasarkan ukuran menjadi tiga jenis utama: *small exosome* (30-50 nm), *medium exosome* (50-100 nm), dan *large exosome* (100-150 nm). *Exosome* MSC mengandung berbagai molekul bioaktif seperti miRNA, protein, dan lipida yang berkontribusi pada regenerasi jaringan, anti-inflamasi, dan modulasi imun, menjadikannya potensi besar dalam terapi medis.⁴⁷⁻⁴⁹

2.5.2. Kandungan *Exosome* MSC

Exosome dari *mesenchymal stem cell* (MSC) mengandung berbagai molekul bioaktif yang memainkan peran penting dalam mengatasi alopecia, suatu kondisi yang ditandai oleh kehilangan rambut yang dapat disebabkan oleh berbagai faktor seperti genetika, hormon, stres, dan peradangan. Berikut adalah beberapa komponen utama dari *exosome* MSC yang berkontribusi dalam mengatasi alopecia:

a. miRNA (*MicroRNA*)

Exosome MSC mengandung sejumlah miRNA yang diketahui mengatur ekspresi gen dan memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel. Misalnya, miRNA-218 dan miRNA-31 telah

terbukti mendorong proliferasi sel dermal papilla dan merangsang pertumbuhan folikel rambut.^{50,51} Selain itu, miRNA-92a dan miRNA-146a memiliki sifat anti-inflamasi yang membantu mengurangi peradangan kulit kepala, yang sering dikaitkan dengan kerontokan rambut.^{52,53}

b. Protein dan Enzim

Exosome MSC mengandung berbagai protein dan enzim yang mendukung regenerasi jaringan dan pertumbuhan sel. Protein seperti Wnt dan PDGF berperan dalam jalur sinyal yang penting untuk siklus pertumbuhan rambut.^{54,55} Wnt, misalnya, terlibat dalam aktivasi fase anagen folikel rambut, sementara PDGF membantu dalam regulasi siklus rambut dan mencegah apoptosis sel dermal papilla.

c. Lipida

Komponen lipida dalam *exosome* MSC juga memainkan peran dalam memodulasi respon seluler dan menjaga integritas membran sel. Lipida seperti *ceramide* dan *sphingomyelin* dapat berperan dalam proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan, yang mendukung lingkungan yang sehat untuk pertumbuhan rambut.⁵⁶

d. Cytokine dan Growth Factors

Exosome MSC mengandung berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan seperti PDGF, VEGF, dan IGF-1 yang berperan dalam angiogenesis, proliferasi sel, dan penyembuhan luka. PDGF dan VEGF khususnya

membantu meningkatkan suplai darah ke folikel rambut, memberikan nutrisi dan oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan rambut. *Insulin-like Growth Factor 1* membantu merangsang pertumbuhan dan proliferasi sel dermal papilla.^{57,58}

2.5.3. Metode Isolasi *Exosome* MSC

Isolasi *exosome* dari *mesenchymal stem cell* (MSC) dari medium kultur adalah proses penting untuk mempelajari fungsi dan aplikasi terapinya. Beberapa metode isolasi telah dikembangkan untuk memastikan kemurnian dan integritas *exosome* yang diisolasi. Berikut adalah beberapa metode yang umum digunakan:

a. Ultrasentrifugasi Diferensial

Metode ini adalah yang paling umum digunakan untuk isolasi *exosome*. Proses ini melibatkan beberapa tahap sentrifugasi pada kecepatan yang berbeda untuk menghilangkan sel, debris seluler, dan partikel-partikel yang lebih besar. Pertama, medium kultur disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk menghilangkan sel-sel dan debris besar. Supernatan kemudian disentrifugasi pada kecepatan lebih tinggi untuk mengendapkan mikrovesikel dan partikel yang lebih besar dari *exosome*. Akhirnya, supernatan disentrifugasi pada kecepatan sangat tinggi (100,000-120,000 x g) untuk mengendapkan *exosome*. *Pellet exosome* kemudian dicuci dan disentrifugasi ulang untuk meningkatkan kemurnian.⁵⁹

b. Ultrafiltrasi

Metode ini menggunakan membran filter dengan ukuran pori tertentu untuk memisahkan *exosome* berdasarkan ukuran. Medium kultur difiltrasi melalui membran untuk menghilangkan partikel yang lebih besar dan molekul kecil, sementara *exosome* tertahan di membran. Ultrafiltrasi sering digunakan sebagai langkah tambahan setelah ultracentrifugasi untuk meningkatkan kemurnian *exosome*.⁵⁹

c. Kromatografi Afinitas

Metode ini memanfaatkan interaksi spesifik antara molekul di permukaan *exosome* dengan ligan yang terikat pada matriks kromatografi. Antibodi yang spesifik terhadap marker permukaan *exosome* seperti CD63, CD81, dan CD9 sering digunakan. Medium kultur dilewatkan melalui kolom yang mengandung ligan ini, sehingga *exosome* yang mengandung marker permukaan yang sesuai akan terperangkap dan kemudian dielusi.⁵⁹

d. Presipitasi Polimer

Metode ini melibatkan penggunaan polimer, seperti *polyethylene glycol* (PEG), yang menginduksi presipitasi *exosome* dari medium kultur. Polimer ini ditambahkan ke medium kultur dan diinkubasi, kemudian campuran disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk mengendapkan *exosome*. Metode ini relatif cepat dan sederhana, namun bisa

menghasilkan eksosom dengan kemurnian yang lebih rendah dibandingkan metode lain.⁵⁹

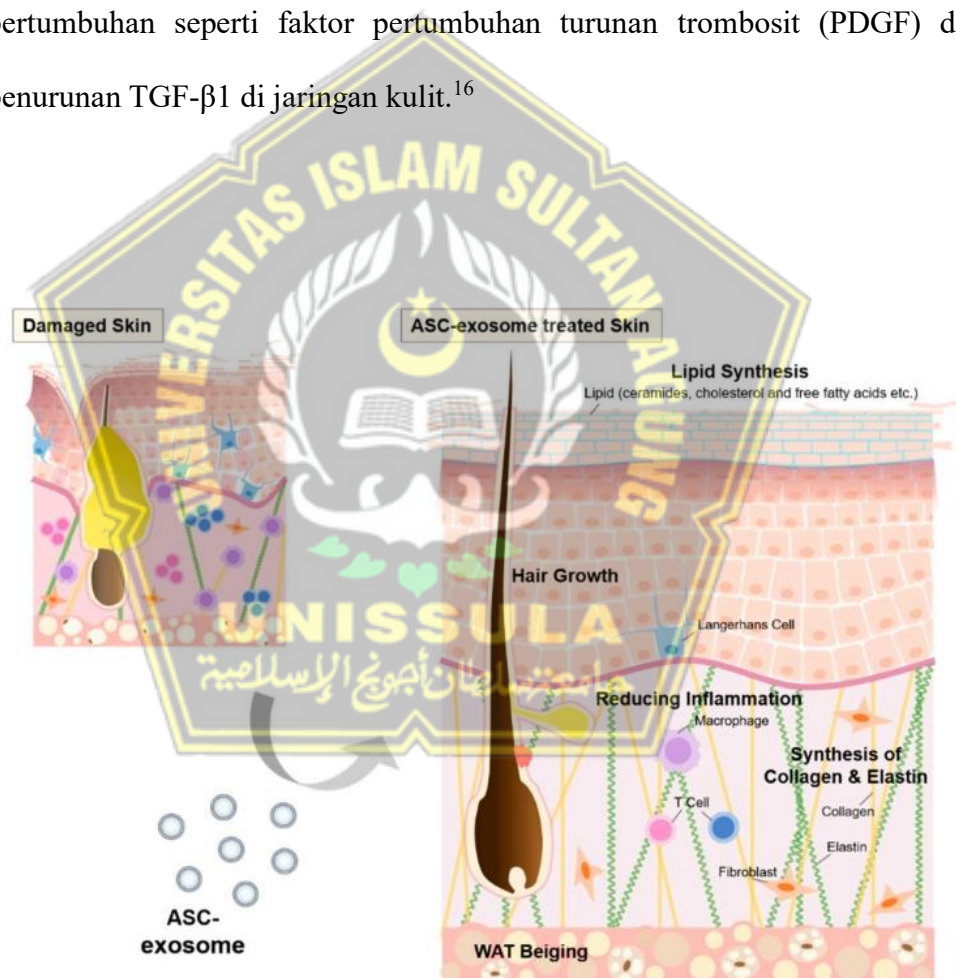
e. Isolasi Berdasarkan Densitas

Metode ini melibatkan penggunaan gradien densitas, seperti *gradien sucrose* atau *iodixanol*, untuk memisahkan *exosome* berdasarkan densitas mereka. Medium kultur ditempatkan pada gradien densitas dan disentrifugasi pada kecepatan tinggi. *Exosome* akan terpisah pada lapisan yang sesuai dengan densitas mereka, yang kemudian dapat diambil secara terpisah.⁵⁹

2.6. Efek *Exosome hypoxia mesenchymal stem cell* terhadap kadar TGF- β dan PDGF pada Alopecia

Eksosom dari *mesenchymal stem cell* mengandung beberapa komponen seperti miRNA, protein, enzim, lipida, sitokin dan *growth factors* (TGF- β dan PDGF) diantaranya yang berkontribusi dalam mengatasi alopecia.⁵ Sinyal TGF- β dan PDGF sangat penting untuk diferensiasi dan pertumbuhan MSC.¹⁰⁸ TGF- β mengatur sistem imun lokal di kulit kepala. Ekspresi TGF- β lebih tinggi dapat menyebabkan aktivitas fibroblas lebih tinggi dan produksi matriks ekstraseluler, yang menyebabkan fibrosis folikel rambut.^{24,25} Fibrosis ini dapat menghalangi folikel rambut untuk kembali ke fase anagen, atau fase pertumbuhan, yang memperburuk kondisi alopecia. Selain itu, TGF- β juga dapat mengontrol ekspresi protein lain yang terlibat dalam siklus rambut, seperti inhibitor protease dan faktor pertumbuhan lain yang dapat berkontribusi pada pertumbuhan rambut. Studi ini menunjukkan hasil positif dalam

meningkatkan kepadatan rambut dan mengurangi area kebotakan.³ Penelitian menunjukkan bahwa MSC, terutama dari jaringan adiposa, dapat mengurangi gejala alopecia areata dan merangsang pertumbuhan rambut baru.¹⁰⁸ Berdasarkan penelitian yang dilakukan Wu *et al.* yang menunjukkan bahwa ADSC-Exos bermanfaat bagi pertumbuhan rambut dari rambut yang ditransplantasikan pada tikus telanjang dengan peningkatan faktor pertumbuhan seperti faktor pertumbuhan turunan trombosit (PDGF) dan penurunan TGF- β 1 di jaringan kulit.¹⁶



Gambar 2.11. Efek Eksosom MSC pada kulit.¹²

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

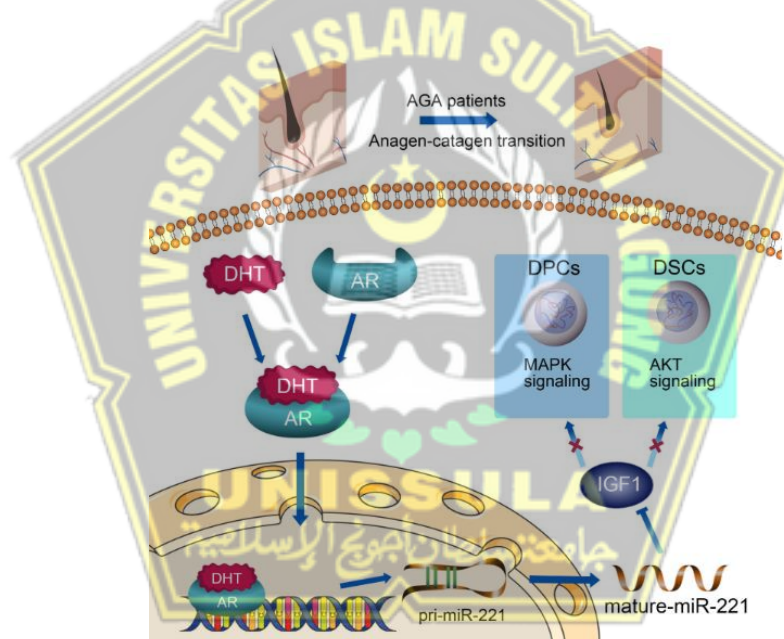
Fluconazole, obat antijamur yang umum digunakan, telah diketahui memiliki efek samping berupa alopecia yang dapat dijelaskan melalui beberapa mekanisme biokimia kompleks. Salah satu mekanisme utama adalah penghambatan enzim lanosterol 14- α -demethylase, yang merupakan langkah penting dalam biosintesis ergosterol pada jamur. Meskipun manusia tidak memproduksi ergosterol, enzim ini memiliki kesamaan struktural dengan enzim yang terlibat dalam sintesis kolesterol. Gangguan ini tidak hanya menghambat fungsi membran sel folikel rambut, tetapi juga berpotensi mengurangi produksi hormon steroid yang penting untuk pertumbuhan rambut.^{82, 83}

Selain gangguan struktural, fluconazole juga dapat meningkatkan stres oksidatif dalam sel-sel folikel rambut. Stres oksidatif ini terjadi ketika produksi spesies oksigen reaktif (ROS) melebihi kapasitas sel untuk menghilangkannya. ROS yang berlebihan dapat merusak komponen seluler penting seperti DNA, protein, dan lipid, yang pada akhirnya mengganggu fungsi normal folikel rambut dan memicu proses inflamasi.⁸⁴ Alopecia juga menyebabkan Apoptosis pada folikel rambut dengan peningkatan ekspresi molekul MHC I pada permukaan sel-sel yang terinfeksi atau mengalami transformasi. Peningkatan ekspresi ini memungkinkan sel T CD8+ untuk

lebih efektif mengenali antigen yang dipresentasikan. Setelah pengenalan antigen, sel T CD8⁺ menjadi aktif dan melepaskan zat sitotoksik seperti perforin dan granzim.^{87,88} Perforin membantu membuka pori pada membran sel target, sementara granzim masuk ke dalam sel dan memicu jalur apoptosis sel.⁸⁹

Pada folikel rambut AA, diyakini bahwa peningkatan aktivitas MHC kelas I dan MHC kelas II dikaitkan dengan perekrutan leukosit ke umbi rambut. Menggambarkan runtuhnya hak istimewa kekebalan folikel rambut, yang menyebabkan segerombolan sel CD8⁺ Sel T, CD4⁺ Sel T, sel penyaji antigen, dan sel *mast* yang mengelilingi folikel. Sel imunoinflamasi ini menyebabkan gangguan siklus pertumbuhan rambut dan kerusakan folikel.⁹⁵ Peningkatan ROS diketahui dapat meningkatkan produksi protein penghambat regenerasi rambut termasuk TGF- β . TGF- β dikenal memiliki efek inhibisi terhadap pertumbuhan rambut dengan menghambat proliferasi sel-sel folikel rambut dan memicu transisi dari fase pertumbuhan (anagen) ke fase istirahat (telogen).⁸⁵ Di sisi lain, penurunan PDGF yang disebabkan oleh efek fluconazole dapat mengurangi dukungan untuk proliferasi dan survival sel-sel folikel rambut. PDGF secara normal memainkan peran penting dalam menjaga kestabilan folikel rambut dengan mempromosikan proliferasi sel-sel prekursor dan mendukung mikro lingkungan yang optimal untuk pertumbuhan rambut.⁸⁶ ROS bertindak sebagai komponen pensinyalan penting dalam imunitas sel T. ROS berdampak pada Aktivasi Sel T.¹¹³ ROS juga telah terbukti sangat penting dalam memediasi beberapa

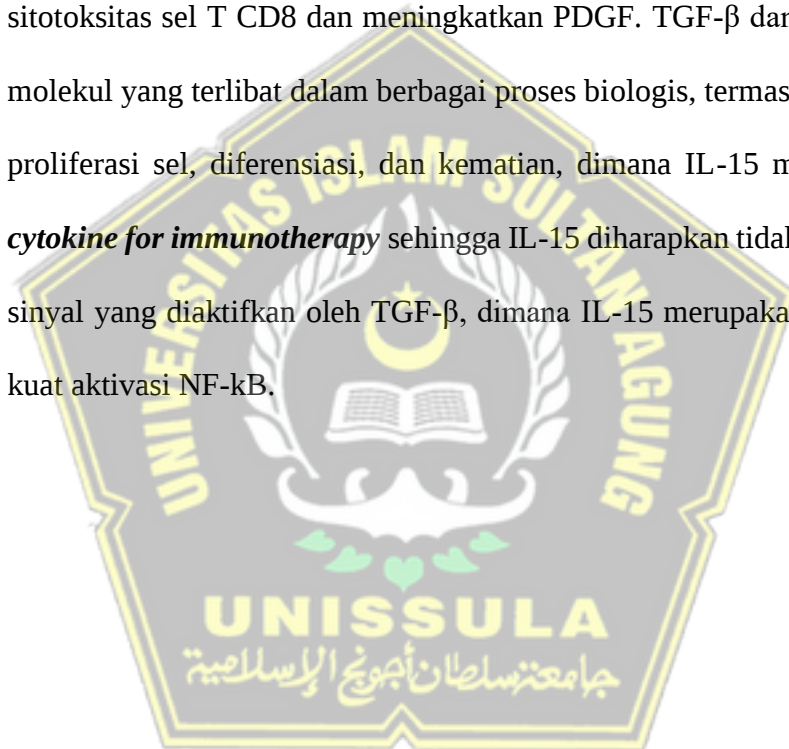
aspek imunitas yang dimediasi limfosit T hilir dari pensinyalan TCR termasuk proliferasi sel T, fungsi efektor, dan kematian.¹¹⁴ NF- κ B memainkan peran utama dalam mengatur jumlah ROS dalam sel, ROS memiliki berbagai peran penghambatan atau stimulasi dalam pensinyalan NF- κ B.¹¹² NF- κ B bertindak sebagai mediator utama yang menginduksi transkripsi gen sitokin dan kemokin yang diperlukan untuk respons imun.⁷ Jalur NF- κ B nonkanonik mengontrol produksi interferon.¹¹⁵ Ekspresi NF- κ B diharapkan pada jalur NF- κ B dapat menghambat apoptosis.

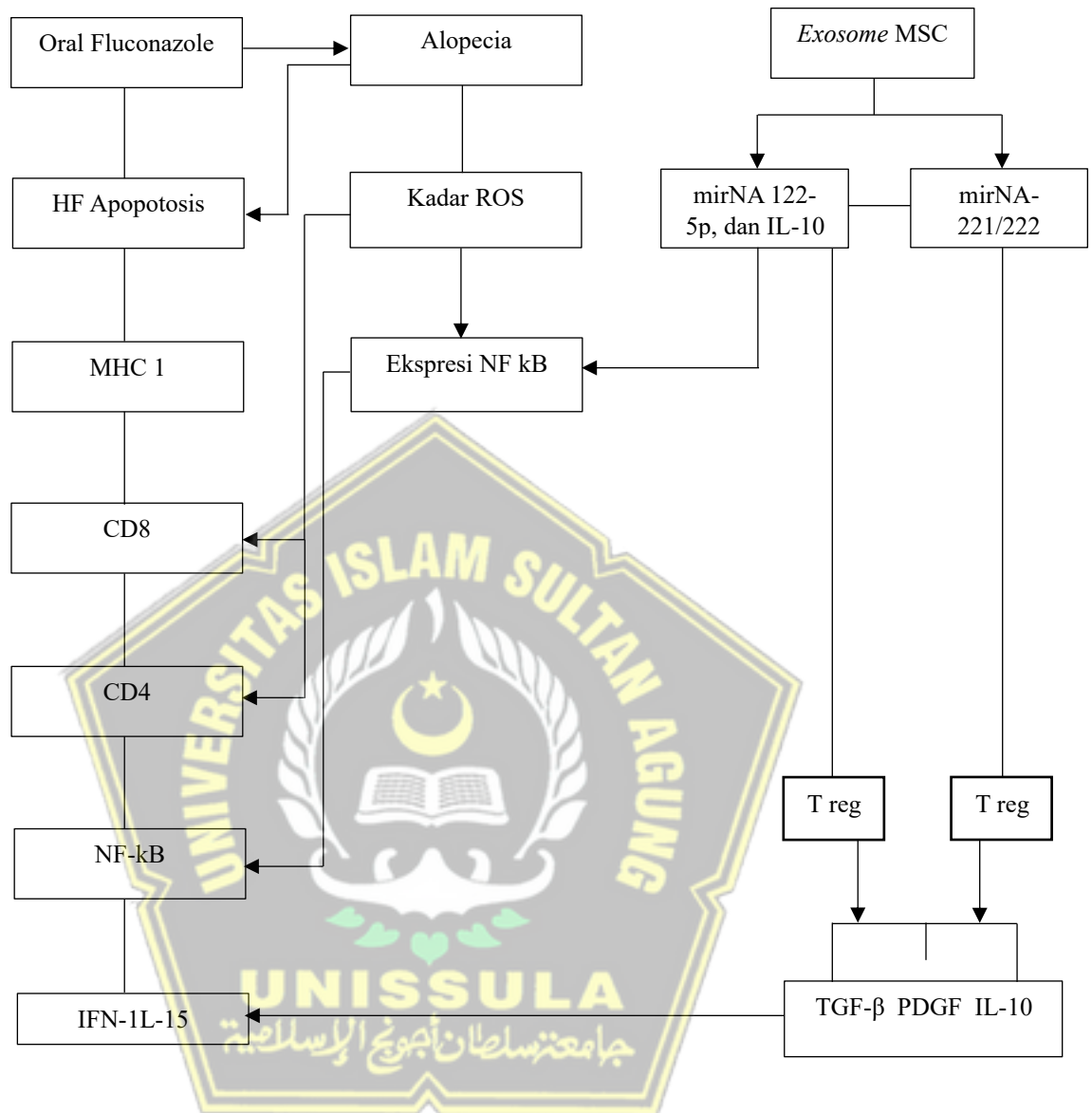


Gambar 3.1. Representasi skema untuk sumbu AR/miR-221/IGF1 yang mengatur jalur MAPK dan jalur PI3K/AKT.⁹²

Terakhir, miRNA-221/222 berperan dalam mengatur siklus pertumbuhan rambut dengan memodulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi sel-sel folikel rambut.⁹² Secara keseluruhan, kombinasi protein dan miRNA yang terdapat dalam *exosome* MSC bekerja sinergis untuk

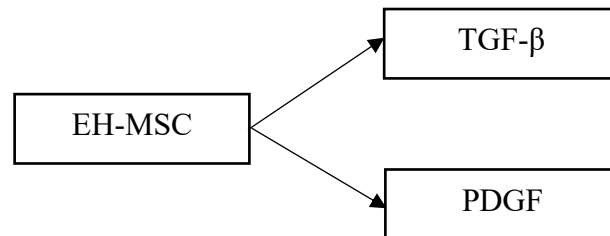
mempengaruhi berbagai aspek alopecia, baik melalui pengaturan peradangan, regenerasi jaringan, maupun regulasi siklus pertumbuhan rambut secara langsung.⁹³ Sel regulator T (Treg), memainkan peran penting dalam menekan respons imun.¹¹¹ Sel regulator T (Treg) mengeluarkan beberapa sitokin penghambat seperti IL-10 dan PDGF juga TGF- β . Sehingga diharapkan dapat mengurangi kadar TGF- β untuk menekan sitotoksitas sel T CD8 dan meningkatkan PDGF. TGF- β dan IL-15 adalah molekul yang terlibat dalam berbagai proses biologis, termasuk pengaturan proliferasi sel, diferensiasi, dan kematian, dimana IL-15 merupakan **key cytokine for immunotherapy** sehingga IL-15 diharapkan tidak mengganggu sinyal yang diaktifkan oleh TGF- β , dimana IL-15 merupakan penginduksi kuat aktivasi NF- κ B.





Gambar 3.2. Kerangka Teori

3.2. Kerangka konsep



Gambar 3.3. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

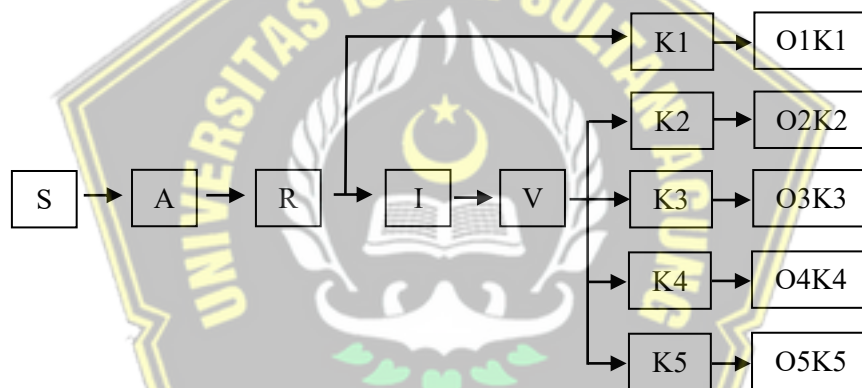
- 3.3.1. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dosis 100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB terhadap kadar TGF-β pada Tikus model *Alopecia like* yang diinduksi Fluconazole.
- 3.3.2. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dosis 100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB terhadap kadar PDGF pada Tikus model *Alopecia like* yang diinduksi Fluconazole.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian pada penelitian ini adalah eksperimental *in vivo* secara *Randomized Post Test only Control Group Design*. Rancangan penelitian menggunakan 5 perlakuan dengan skema penelitian sebagai berikut :



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian⁶⁰

Keterangan:

S = Sampel

A = Aklimatisasi hewan coba

R = Randomisasi hewan coba

I = Induksi Fluconazole

V = Validasi

K1 = Tikus sehat, tidak diberi perlakuan

K2 = Tikus diinduksi Fluconazole dengan diberi NaCl 0,9%

K3 = Tikus diinduksi Fluconazole dengan diberi Minoxidil 5%

K4 = Tikus diinduksi Fluconazole dengan diberi *Exosome hypoxia* MSC 100

$\mu\text{g/kgBB}$

K5 = Tikus diinduksi Fluconazole dengan diberi *Exosome hypoxia* MSC 200

$\mu\text{g/kgBB}$

O1K1 = Observasi kadar TGF- β dan PDGF kelompok K1

O2K2 = Observasi kadar TGF- β dan PDGF kelompok K2

O3K3 = Observasi kadar TGF- β dan PDGF kelompok K3

O4K4 = Observasi kadar TGF- β dan PDGF kelompok K4

O5K5 = Observasi kadar TGF- β dan PDGF kelompok K5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel penelitian

a. Variabel Bebas penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah

Exosome hypoxia MSC

b. Variabel Tergantung penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah

kadar TGF- β dan PDGF

c. Variabel Prakondisi penelitian ini adalah pemberian fluconazole 35

mg/kgBB per oral menggunakan sonde.

4.2.2 Definisi Operasional

a. Injeksi *exosome hypoxia* MSC (EH-MSC)

Exosome dari *mesenchymal stem cell* (MSC) adalah vesikel ekstraseluler yang mengandung berbagai molekul bioaktif seperti miRNA, protein, dan lipida yang berkontribusi pada regenerasi jaringan, anti-inflamasi, dan modulasi imun. *Exosome* MSC diisolasi dengan metode TFF. Media kultur disaring menggunakan filter 100 kDa dan 500 kDa. Validasi dilakukan dengan *flow cytometry* menggunakan penanda CD81, CD63, dan CD9. *Exosome hypoxia* MSC yang tervalidasi disimpan di tabung 2,5 mL pada suhu 2-8 °C. Injeksi exosome terbagi dalam beberapa kelompok yaitu dosis EH-MSC 100 µg/mL secara subkutan sebanyak 0,1 cc dibagi menjadi 5 titik, dosis EH-MSC 200 µg/mL secara subkutan sebanyak 0,2 cc dibagi menjadi 5 titik.

Skala: Ordinal

b. Kadar TGF-β

TGF-β adalah protein yang berperan dalam regulasi banyak proses seluler, termasuk pertumbuhan sel, apoptosis, dan diferensiasi. Pada tikus model alopecia yang diinduksi oleh fluconazole, pemberian *exosome* MSC dapat mengurangi kadar TGF-β pada tikus yang diinduksi alopecia. Diukur menggunakan metode ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) dari sampel kulit tikus setelah perlakuan dengan *exosome* MSC pada hari ke-29.

Skala: Rasio

c. Kadar PDGF

Protein yang disebut *Platelet derivated Growth Factor* (PDGF) sangat penting dalam penyembuhan luka, peretumbuhan, dan pembelahan. PDGF terutama dilepaskan oleh trombosit darah, serta jenis sel lain seperti makrofag. Pemberian *exosome* MSC dapat meningkatkan kadar PDGF pada tikus model alopecia yang telah diinduksi oleh fluconazole. Diukur menggunakan metode ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) dari sampel kulit tikus setelah perlakuan dengan *exosome* MSC pada hari ke-29.

Skala: Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek penelitian

Tikus jantan galur Wistar berusia 6-8 minggu dengan berat 200-250 gram dipilih untuk penelitian ini setelah dianggap layak oleh dokter hewan dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia. Tikus dipelihara di lab berventilasi cukup dan suhu ruangan 20-28°C dengan makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria inklusi

- a. Tikus galur Wistar
- b. Jenis kelamin jantan

- c. Usia 6-8 minggu
- d. Berat badan 200-250 g
- e. Tidak memiliki kelainan anatomis
- f. Tikus bergerak secara aktif.

4.3.2.1.1. Model tikus kriteria inklusi

Tikus dengan alopecia: Tikus yang di induksi dengan fluoconazole dosis divalidasi dengan sediaan HE

Secara makroskopis : Tikus yang diberi fluconazole oral selama 14 hari yang divalidasi secara makroskopis, rambut tidak tumbuh setelah dicukur, ditemukan Gambaran *sel papilla dermal* (DPC) mengecil HE.

4.3.2.2. Kriteria eksklusi

- a. Memiliki kelainan anatomis.
- b. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
- c. Tikus yang sakit selama masa penelitian.

4.3.2.3. Kriteria *drop out*

- a. Tikus mengalami infeksi atau
- b. Tikus mati selama penelitian.

4.4. Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

- a. Lakukan pengambilan sampel jaringan kulit yang telah diberi perlakuan menggunakan peralatan steril dan dilakukan di atas es secara cepat untuk mencegah degradasi oleh protease.

- b. Letakkan jaringan yang telah diambil ke dalam tabung cryovial dan rendam dalam nitrogen cair untuk melakukan "*snap freeze*".
- c. Simpan sampel pada suhu -80°C untuk digunakan nanti atau simpan di atas es untuk homogenisasi segera.
- d. Untuk potongan jaringan sekitar ~ 5 mg, tambahkan sekitar ~ 300 μL larutan radioimunopresipitasi (RIPA) buffer ditambah dengan protease inhibitor ke dalam tabung dan homogenkan menggunakan homogenizer Listrik selama 2 menit pada suhu 4°C
- e. Bilas mata homogenizer dua kali dengan menggunakan 300 μL larutan RIPA buffer
- f. Lakukan sentrifugasi hasil homogenisasi selama 20 menit pada 13.000 rpm pada suhu 4°C .
- g. Setelah itu, letakkan tabung di atas es, ambil supernatan ke dalam tabung yang baru dan dingin, dan simpan sampel pada suhu -80°C hingga proses analisis berikutnya dilakukan.

4.5. Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dan besaran sampel dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

$$(n - 1) (5 - 1) \geq 15$$

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow 5 \text{ (pembulatan)}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, penelitian menggunakan lima ekor sampel per perlakuan. Untuk menghadapi risiko mortalitas pada tikus, setiap kelompok ditambah sampel sebanyak satu ekor dari jumlah hitungan menjadi total enam ekor per perlakuan. Dengan demikian, jumlah total sampel yang digunakan adalah 30 ekor.

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam kultur MSC dan isolasi *exosome* antara lain meliputi BSC, CO₂ inkubator, sentrifuge, *uPulse tangential flow filtration* dan membran filtrasi TFF (*Tangential Flow Filtration*) berukuran 100 kda dan 500 kda digunakan untuk isolasi *exosome* dari medium kultur MSC. Alat yang digunakan untuk validasi MSC dan *Exosome hypoxia* MSC antara lain *Flowcytometer*, mikroskop *inverted*, *incubator*. Peralatan lain yang digunakan antara lain mikropipet, tabung sentrifuge, pelat kultur sel, botol beher, *shaker*, pH meter, *autoclave* dan lampu UV.

4.6.2. Bahan Penelitian

Bahan yang dipakai dalam penelitian meliputi bahan kultur yang terdiri dari DMEM, Fetal Bovine Serum, Phospat Buffer Saline, Antibiotik dan anti jamur, Flask kultur, sentrifuge tube, pipet tip. Bahan yang digunakan untuk isolasi *exosome* antara lain NaCl, dan Aquabidest.

Bahan penelitian yang dibutuhkan dalam proses pembuatan animal model dan pengambilan sampel antara lain alkohol 70% dan kapas steril,

ketamin, xylazine, vial tube, RIPA buffer dan pisau bisturi. Bahan-bahan yang diperlukan untuk analisis ELISA antara lain Elisa Kit Rat TGF-beta (Elabscience No Cat: E-EL-R2856) dan PDGF (Elabscience No Cat: E-EL-R2491).

4.7. Cara Penelitian

4.7.1. *Ethical clearance*

Setelah mendapatkan persetujuan dari pembimbing dan penguji *Ethical clearance* penelitian diajukan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang.

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

Seluruh prosedur dilakukan di kabinet biosafety kelas 2 dengan tingkat sterilitas dan peralatan steril yang tinggi.

- a. Setelah dikumpulkan, *umbilical cord* dimasukkan ke dalam wadah steril yang diberi NaCl 0,9%
- b. Dengan menggunakan pinset, masukkan *umbilical cord* ke dalam cawan petri dan gunakan PBS untuk membersihkannya secara menyeluruh
- c. *Umbilical cord* janin tikus dipotong dan pembuluh darahnya dibuang
- d. Setelah *umbilical cord* dicincang halus, diletakkan secara merata di dalam labu 25T dan diamkan selama tiga menit agar tisu menempel pada permukaan labu
- e. Media (DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan sedikit demi sedikit hingga jaringan tertutup

- f. Eksplan disimpan dalam inkubator dengan 5% CO₂ pada suhu 37°C
- g. Setelah prosedur kultur dimulai, sel akan berkembang setelah sekitar 14 hari
- h. Setiap tiga hari, media diganti dengan cara membuang setengahnya dan menambahkan yang baru dan penuh sebagai gantinya
- i. Pemeliharaan sel berlanjut hingga 80% sel konfluensi.

4.7.3. Proses Hipoksia

- a. MSCs dengan konfluensi 80% dimasukkan, dan ditambahkan hingga 10 mL media penuh
- b. Selanjutnya *flask* yang mengandung MSCs ditempatkan di dalam ruang hipoksia
- c. Dalam mengukur jumlah oksigen dalam ruangan, gas nitrogen dialirkan melalui katup inlet dan pengukur oksigen ditempatkan pada lubang sensor
- d. Nitrogen disuntikkan sampai oksigen 5% ditunjukkan oleh jarum indikator
- e. *Chamber* yang telah diisi *flask* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- f. Media kultur dikeluarkan setelah 24 jam dan diisolasi dengan metode TFF untuk menghasilkan EH-MSCs.

4.7.4. Pembuatan *Exosome* Hipoksia MSCs

Exosome MSC diisolasi menggunakan metode TFF. Langkah yang dilakukan antara lain media kultur MSC dikumpulkan dalam botol steril dan

kemudian disaring menggunakan alat uPulse TFF dengan filter 100 kDa dan 500 kDa untuk menyisihkan partikel besar. Hasil filtrasi kemudian dilakukan validasi kandungan *Exosome hypoxia* MSC menggunakan flowcytometri dengan penanda permukaan berupa CD81, CD63, dan CD9. Hasil yang telah tervalidasi mengandung *Exosome hypoxia* MSC disimpan dalam tabung 2,5 mL dan disimpan dalam suhu 2-8 °C.



Gambar 4.2. Isolasi MSC dan Pembuatan *Exosome*

4.7.5. Pembuatan alopecia dan pemberian perlakuan pada subjek percobaan

- a. Setelah satu minggu adaptasi, tikus diberikan kombinasi *xylazine* (20 mg/kgbb) dan ketamine (60 mg/kgbb) untuk menginduksi anestesi.
- b. Mencukur rambut pada punggung tikus
- c. Tikus kelompok K1 tidak di berikan treatmen apapun. Tikus kelompok K2 sd K4 diberikan *fluconazole* 35 mg/kgBB per oral selama 14 hari menggunakan sonde
- d. Hari ke-22, dilakukan validasi
- e. Dilakukan injeksi Subkutan pada punggung tikus. Injeksi NaCL dilakukan pada K2, Injeksi Minoxidil 5% pada K3, injeksi *Exosome* hipoksia MSC dosis 100µg/kgbb pada K4, dan Injeksi *Exosome* hipoksia MSC dosis 200µg/kgbb pada K5
- f. Hari ke-29 dilakukan pemeriksaan sampel
- g. Jaringan yang telah dihomogenisasi disimpan dalam -80°C hingga proses analisis.
- h. Periksa kadar TGF-β dan PDGF menggunakan ELISA sesuai protokol pabrik.

4.7.6. Metode Validasi

- a. Validasi secara makroskopis pada hari ke-22 dimana dinyatakan positif jika daerah yang dicukur tidak menunjukkan pertumbuhan rambut kembali
- b. Validasi mikroskopis dengan pewarnaan *Hematoksin-Eosin* (HE) dimana dinyatakan mengalami alopecia jika tidak ditemukan folikel

dalam fase anagen pada kulit tikus.

Untuk melakukan validasi mikroskopis dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Sampel kulit diperoleh dari masing-masing kelompok dan digunakan untuk membuat potongan histologis menggunakan pewarnaan HE dan teknik paraffin. Sampel kulit tikus diperoleh dari masing-masing kelompok dan diawetkan dalam larutan NBF 10% atau *Neutral Buffer Formalin*.
2. Sampel kulit dibersihkan dari sisa larutan fiksatif dengan membilasnya menggunakan alkohol 70%.
3. Sampel ditandai dan ditempatkan dalam keranjang tisu setelah difiksasi dalam larutan BNF 10.
4. Alkohol absolut dan alkohol bergradasi 70, 80%, 90%, dan 96% digunakan untuk mendehidrasi sampel jaringan.
5. Sampel dimasukkan ke dalam toluol selama satu jam, atau hingga menjadi bening atau transparan.
6. Sampel kemudian diinfiltrasi menggunakan parafin dalam oven bersuhu 560°C. Caranya dengan memasukkannya ke dalam kombinasi toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Masing-masing selama tiga puluh menit, sampel kulit direndam dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III.
7. Kemudian sampel ditanam (*embedding*) dalam parafin dan *blocking* ditunggu hingga paraffin mengeras.

8. Dengan menggunakan mikrotom, potong blok jaringan menjadi irisan berukuran 6 μ m. Kemudian letakkan potongan-potongan tersebut di atas permukaan kaca yang telah dilapisi perekat *Mayer Albumin*, ditetesi sedikit air suling, dan dipanaskan di atas *hot plate* hingga menempel sempurna
9. Sebelum pewarnaan jaringan, parafin dihilangkan (*deparaffinisasi*) dengan xylol selama sehari penuh
10. Pewarna HE digunakan untuk pewarnaan. Kertas kering digunakan untuk menyerap kandungan xylol, yang kemudian secara bertahap ditambahkan ke air sulingan dan larutan alkohol dengan persentase yang semakin rendah (96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30%), masing-masing, untuk durasi 1- 2 menit
11. Setelah jaringan diwarnai selama 5–10 detik dengan hematoksin, jaringan dibilas lagi selama 10 menit dengan air mengalir
12. Selama 3-5 menit, preparata direndam dalam alkohol masing- masing 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%
13. Selanjutnya jaringan diwarnai dengan pewarnaan eosin selama 2 menit. Kemudian dikeringkan dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam larutan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, dan 96%) masing-masing selama 3-5 menit
14. Setelah 15 menit *clearing xylol*, balsam Kanada ditetaskan ke dalam sediaan histologi

15. Memasang *slide* jaringan dengan kaca penutup, memberi label, dan memasukkannya ke dalam kotak sediaan melengkapi prosedur ini.

4.7.7. Terminasi dan pengambilan jaringan

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

4.7.8. Preparasi Sampel

- a. Lakukan pengambilan sampel jaringan kulit yang telah diberi perlakuan menggunakan peralatan steril dan dilakukan di atas es secara cepat untuk mencegah degradasi oleh protease
- b. Letakkan jaringan yang telah diambil ke dalam tabung *cryovial* dan rendam dalam nitrogen cair untuk melakukan "*snap freeze*"
- c. Simpan sampel pada suhu -80°C untuk digunakan nanti atau simpan di atas es untuk homogenisasi segera
- d. Untuk potongan jaringan sekitar ~ 5 mg, tambahkan sekitar ~ 300 μL larutan RIPA buffer ditambah dengan protease inhibitor ke dalam tabung dan homogenkan menggunakan homogenizer Listrik selama 2 menit pada suhu 4°C
- e. Bilas mata homogenizer dua kali dengan menggunakan 300 μL larutan RIPA *buffer*

- f. Lakukan sentrifugasi hasil homogenisasi selama 20 menit pada 13.000 rpm pada suhu 4°C
- g. Setelah itu, letakkan tabung di atas es, ambil supernatan ke dalam tabung yang baru dan dingin, dan simpan sampel pada suhu -80°C hingga proses analisis berikutnya dilakukan

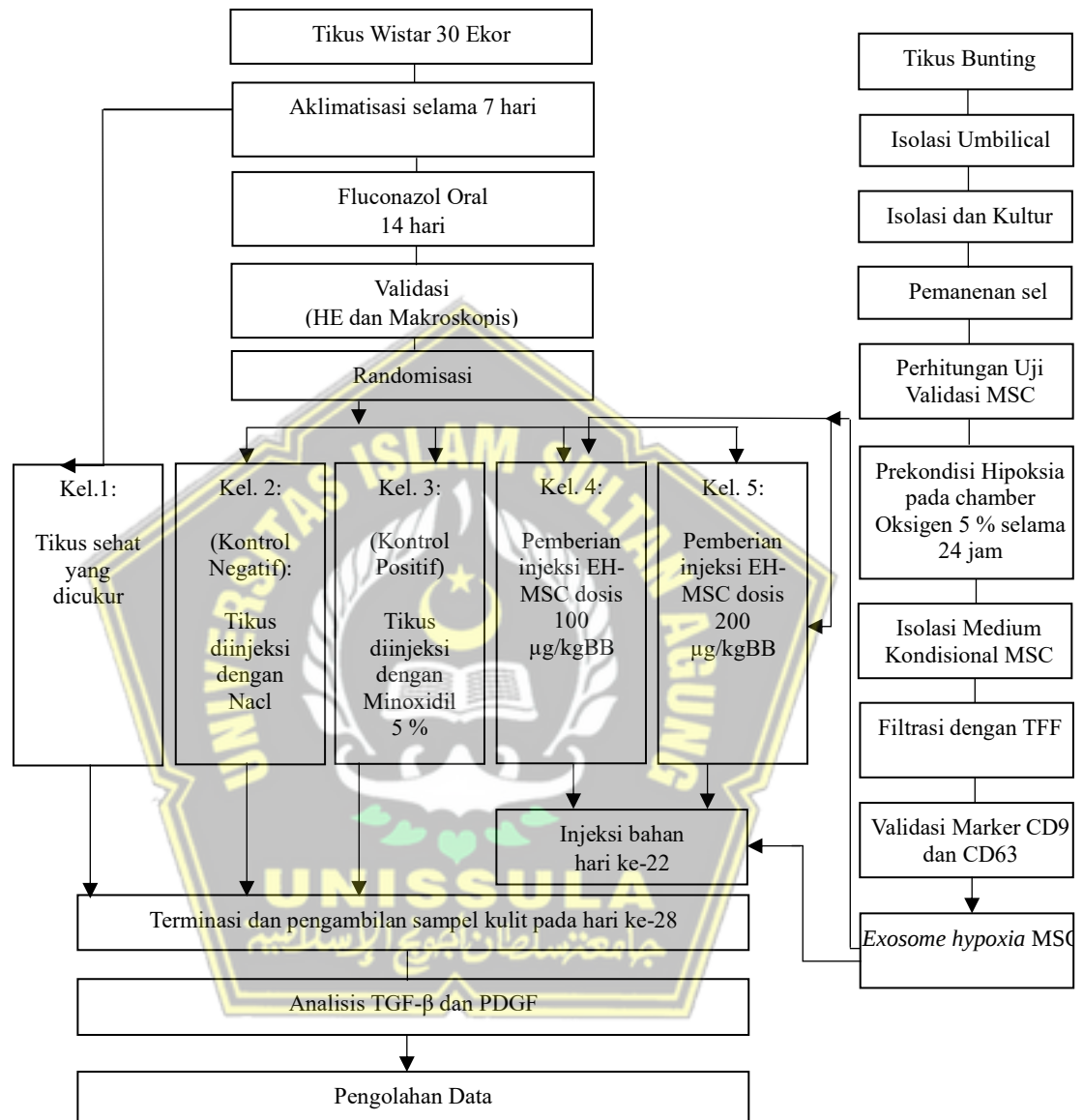
4.7.9. Analisis ELISA

- a. Tentukan sumuran untuk standar, blanko, dan sampel yang akan dianalisis
- b. Tambahkan sebanyak 100 µL larutan standar, blanko, dan sampel ke sumur yang telah ditentukan
- c. Tutup pelat sumuran menggunakan plastik penutup hingga rapat untuk mencegah terjadinya penguapan reagen, kemudian inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C
- d. Buang cairan dari setiap sumur, tanpa pembilasan. Segera tambahkan 100 µL larutan Antibodi Deteksi Biotinilasi ke setiap sumur
- e. Tutupi pelat dengan penutup baru dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C
- f. Lakukan pencucian dengan menambahkan 350 µL larutan *wash buffer* ke setiap sumur, diulangi sebanyak 3 kali
- g. Tambahkan 100 µL Konjugat HRP ke setiap sumur
- h. Tutupi pelat dengan penutup baru, inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C

- i. Buang larutan dari setiap sumur, dan lakukan proses pembilasan sebanyak 5 kali seperti pada langkah 3
- j. Tambahkan 90 μ L Reagen Substrat ke setiap sumur
- k. Tutupi pelat dengan penutup baru, inkubasi selama sekitar 15 menit pada suhu 37°C
- l. Tambahkan 50 μ L larutan Stop ke setiap sumur
- m. Ukur *Optical Density* (OD) dari setiap sumur sekaligus menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.



4.8. Alur Penelitian



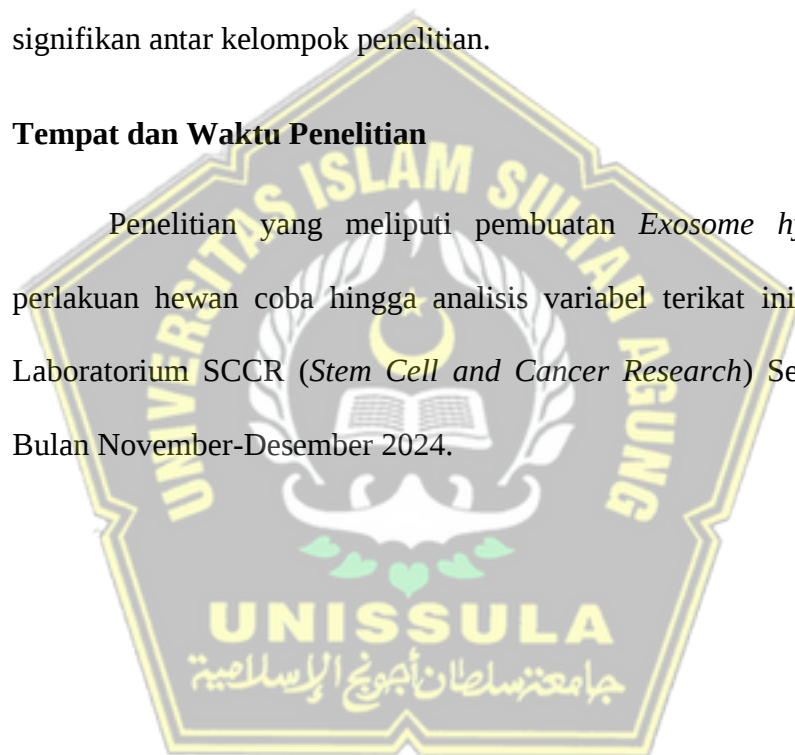
Gambar 4.3. Alur Penelitian

4.9. Analisa Data

Selanjutnya, dilakukan analisis normalitas dan variasi data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene's Test* dan dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*. Analisis antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD untuk kadar TGF- β dan uji *Post Hoc* untuk kadar PDGF. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.

4.10. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang meliputi pembuatan *Exosome hypoxia* MSC, perlakuan hewan coba hingga analisis variabel terikat ini dilakukan di Laboratorium SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*) Semarang, pada Bulan November-Desember 2024.



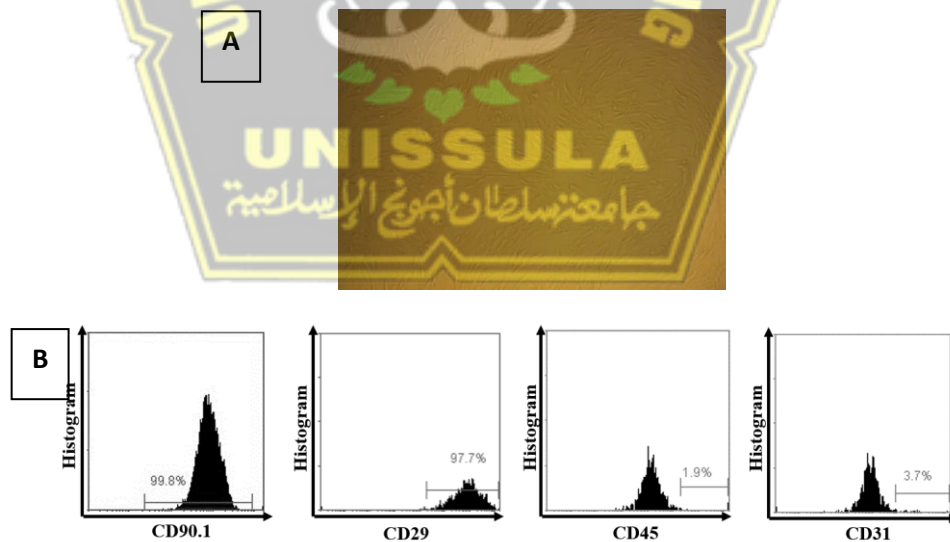
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Validasi EH-MSC (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*)

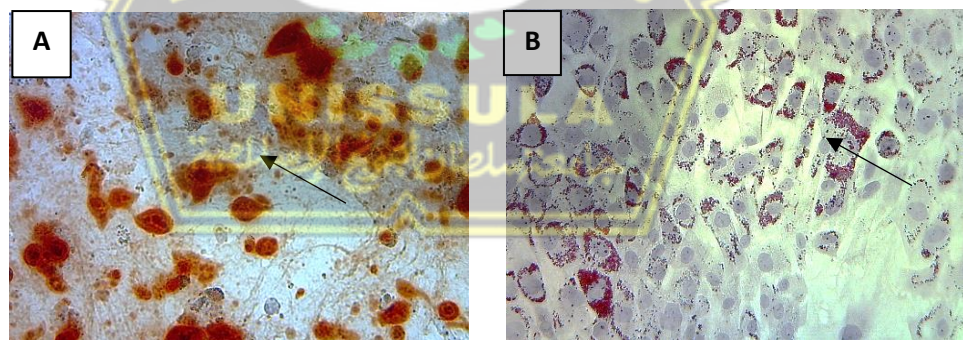
Mesenchymal stem cell diisolasi di Laboratorium SCCR Indonesia di Semarang, menggunakan sumber berupa tali pusat tikus pada usia berusia 21 hari kehamilan. Setelah proses isolasi, sel-sel tersebut dikultur dalam *Flask* kultur yang berisi media DMEM. Setelah mencapai pasase kelima, analisis morfologi sel, menunjukkan terdapat sel yang menyerupai *spindle* saat diamati dengan mikroskop dan melekat di atas permukaan flask (Gambar 5.1A).



Gambar 5.1. Morfologi MSC. (A) morfologi MSC berbentuk fibroblas-like (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31.

Analisis identitas sel menggunakan *surface marker* MSC menggunakan metode *flow cytometry* menunjukkan bahwa sel yang dikultur secara kuat mengekspresikan CD90 (99,50%) dan CD29 (96,10%), dan hanya sedikit mengekspresikan CD45 (1,30%) dan CD31 (6,60%) (Gambar 5.1B). Hal ini menunjukkan bahwa sel yang dikultur dari tali pusar memiliki karakteristik MSC.

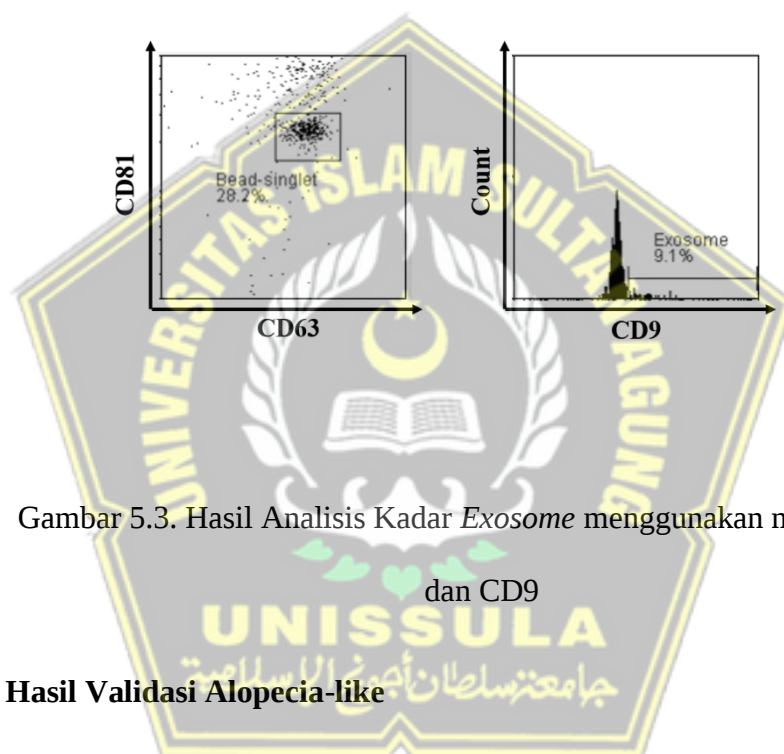
Penelitian ini juga memastikan kapasitas MSC dalam diferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa seperti sel osteosit dan sel adiposity yaitu dengan cara memberi medium spesifik menginduksi diferensiasi, baik menjadi osteosit maupun adiposit. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa MSC mampu mengalami diferensiasi menjadi osteosit dan adiposity yang terlihat oleh Alizarin Red dan oil Red O. (Gambar 5.2 A dan B).



Gambar 5.2. Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin red dan (B) Adiposit pada pewarnaan oil red o (ditunjukkan dengan panah hitam, perbesaran 400x).

Setelah tervalidasi, MSC kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam menggunakan box

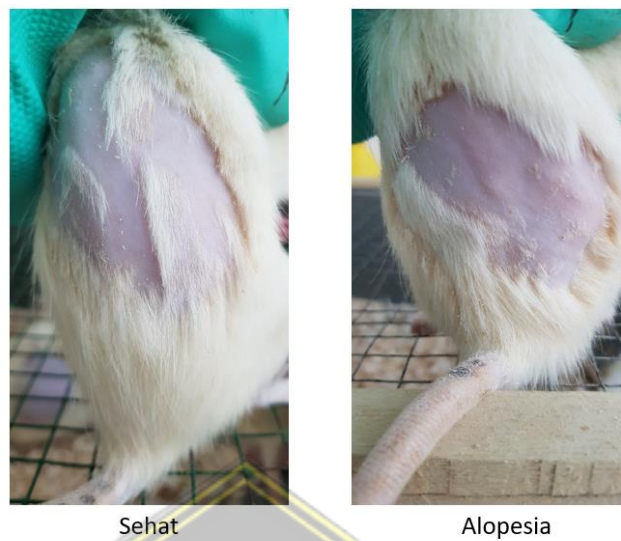
hipoksia. Setelah itu, medium kultur MSC yang mengandung sekretom MSC dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode TFF dengan ukuran 100-500 kDa sehingga dapat diperoleh EH-MSC. Setelah diisolasi kadar *exosome* dianalisis menggunakan metode *flowcytometry* dan didapatkan bahwa kadar *exosome* yang didapatkan sebesar 0.74 ug/mL (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. Hasil Analisis Kadar *Exosome* menggunakan marker CD63 dan CD9

5.1.2. Hasil Validasi Alopecia-like

Validasi pembentukan model Alopecia-like pada tikus dilakukan secara visual dengan membandingkan kondisi densitas rambut pada tikus sehat dan tikus yang diinduksi fluconazole. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tikus sehat memiliki densitas rambut yang lebih padat, sedangkan tikus yang diinduksi fluconazole memiliki densitas rambut yang lebih rendah, sebagaimana terlihat dalam Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Validasi Alopecia-like Tikus sehat

(A) memiliki kondisi densitas rambut yang lebih tinggi, sedangkan tikus yang dipapar fluconazole memiliki densitas rambut yang lebih rendah (B)

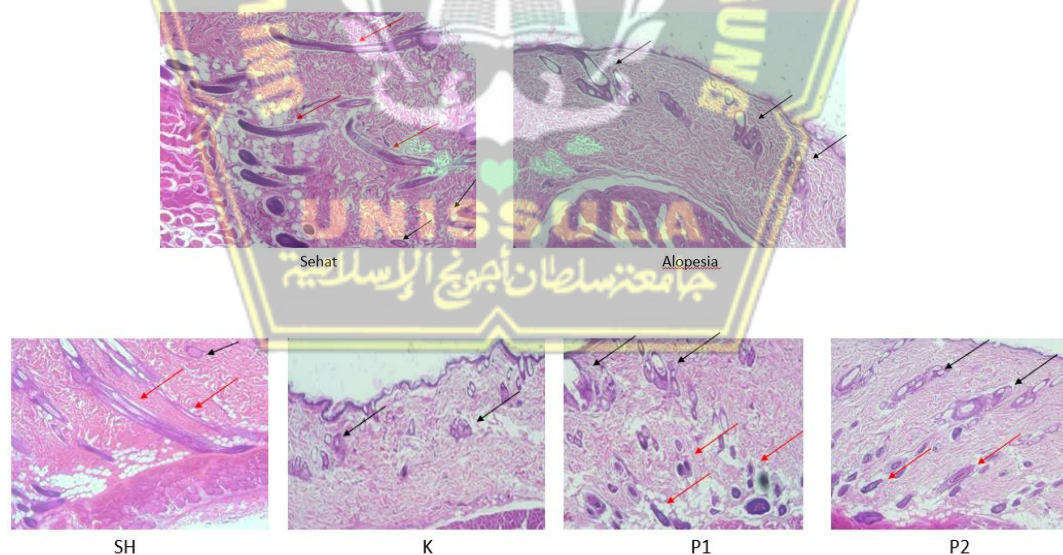


Gambar 5.5. Hasil mikroskopis pasca pemberian EH-MSCs

Setelah tikus tervalidasi mengalami Alopecia-like, tikus yang tanpa induksi fluconazole digunakan sebagai kontrol sehat (K1), sedangkan tikus yang mengalami Alopecia-like akibat induksi fluconazole dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara acak yaitu K2 (tikus Alopecia-like dengan injeksi Aquabides dengan dosis 100 uL secara subkutan), K3 (tikus

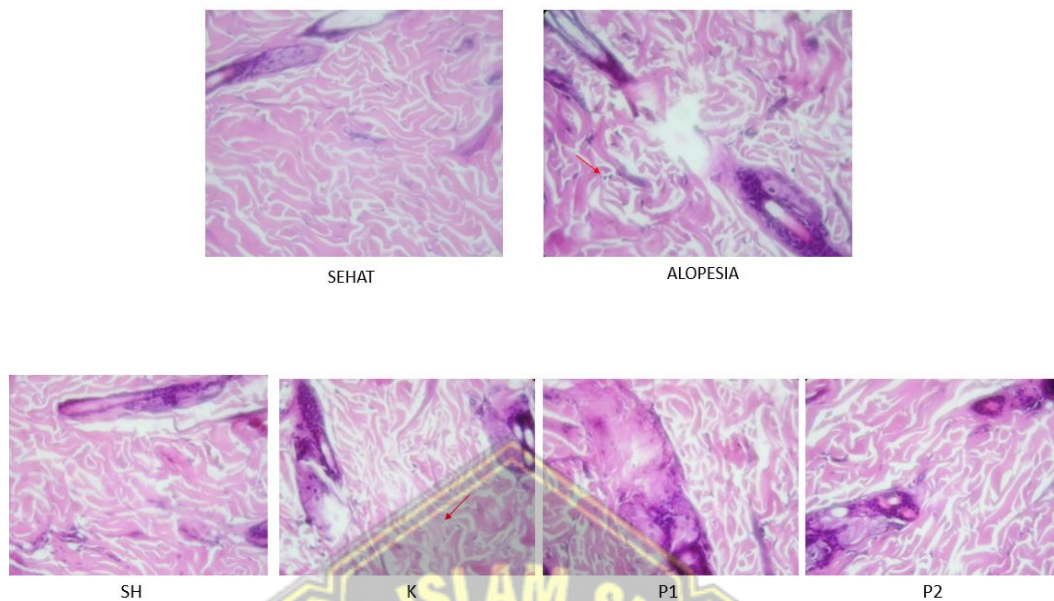
Alopecia-like dengan injeksi minoxidil dengan dosis 100 uL secara subkutan), K4 dan K5 (tikus Alopecia-like dengan injeksi EH-MSC dengan dosis masing-masing 100 µg dan 200 µg secara subkutan).

Injeksi EH-MSC diberikan sekali pada hari ke-1 setelah tikus dinyatakan mengalami alopecia-like, dan pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-14 setelah injeksi. Jaringan kulit kemudian dihomogenisasi menggunakan RIPA buffer yang telah ditambahkan inhibitor proteinase untuk menghambat kerusakan protein. Setelah jaringan terhomogenisasi menjadi suspensi, proses sentrifugasi dilakukan, dan supernatan dikumpulkan untuk analisis kadar TGF-β dan PDGF menggunakan metode ELISA.



Gambar 5.6. Validasi folikel HE

Panah hitam menunjukkan fase telogen dan panah merah menunjukkan fase anagen



Gambar 5.7. Validasi sel inflamasi HE

Panah merah menunjukkan limfosit

5.1.3. Kadar TGF- β

Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Kadar TGF- β

Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	
TGF-β	36,33 $\pm$ 3,15	7,87 $\pm$ 1,38	17,93 $\pm$ 2,41	28,47 $\pm$ 1,64	34,14 $\pm$ 1,77	
Shapiro Wilk	0,78	0,55	0,31	0,84	0,33	
Lavene test						0,26
One Way Anova						0,001

Data kadar TGF- β dari lima kelompok (K1 hingga K5) menunjukkan

variasi yang signifikan dalam konsentrasi. Kelompok K1 memiliki kadar

TGF- β tertinggi, yaitu 36,33 $\pm$ 3,15 pg/mL, diikuti oleh K5 dengan 34,14 $\pm$

1,77 pg/mL, dan K4 dengan 28,47 $\pm$ 1,64 pg/mL. Kelompok K3 memiliki

kadar yang lebih rendah sebesar $17,93 \pm 2,41$ pg/mL, sementara kadar terendah ditemukan pada K2 dengan $7,87 \pm 1,38$ pg/mL.

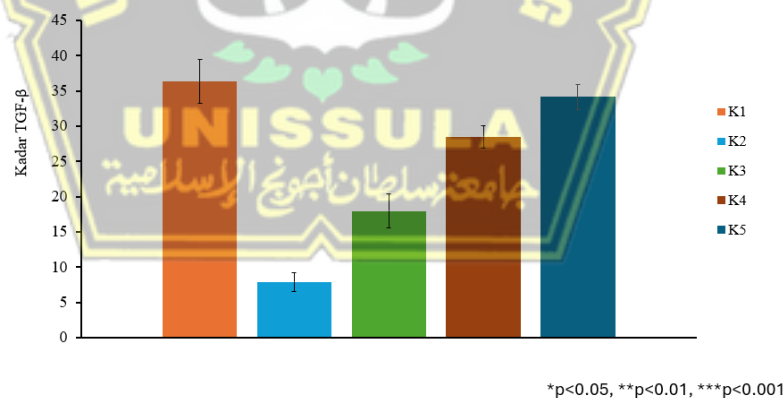
Analisis distribusi data menggunakan uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa distribusi data pada setiap kelompok adalah normal ($p>0,05$). Selanjutnya, uji homogenitas varians menggunakan Levene test mengonfirmasi bahwa data kadar TGF- β pada kelima kelompok memiliki varians yang homogen ($p>0,05$).

Analisis perbedaan kadar TGF- β antar kelompok dilakukan menggunakan One-Way ANOVA, yang menghasilkan nilai signifikan secara statistik ($p<0,05$). Hasil ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok-kelompok tersebut. Dengan kata lain, perlakuan atau kondisi pada setiap kelompok memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar TGF- β .

Tabel 5.2. Perbedaan rerata kadar TGF- β antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc LSD

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0,001
	K3	0,001
	K4	0,001
	K5	0,092
K2	K3	0,001
	K4	0,001
	K5	0,001
K3	K4	0,001
	K5	0,001
K4	K5	0,001

Berdasarkan data kadar TGF- β yang memiliki beda nyata setelah uji uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji post hoc LSD, karena data bersifat normal dan homogen. Data hasil uji post hoc LSD tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.2. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K4 berbeda signifikan dibanding dengan seluruh ($p < 0,05$), sedangkan K5 berbeda secara signifikan dengan kelompok K2, K3, dan K4 ($p < 0,05$), dan tidak berbeda secara signifikan dibanding dengan K1 ($p > 0,05$). Data juga menunjukkan data kadar TGF- β K5 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya hingga ke kadar TGF- β yang sama dengan kelompok sehat.



Gambar 5.8. Grafik Kadar TGF- β .

Terdapat pola penurunan yang ditunjukkan adalah *dose dependent manner* dimana dosis tertinggi menghasilkan kenaikan kadar TGF- β signifikan.

5.1.4 Kadar PDGF

Tabel 5.3. Data Hasil Analisis Kadar PDGF

Variabel	Kelompok					P
	K1 (pg/mL) Rerata±SD	K2 (pg/mL) Rerata±SD	K3 (pg/mL) Rerata±SD	K4 (pg/mL) Rerata±SD	K5 (pg/mL) Rerata±SD	
PDGF	8,68±0,40	4,12±0,47	6,01±0,18	7,42±0,09	7,99±0,44	
Shapiro Wilk	0,54	0,06	0,33	0,42	0,44	
Lavene test						0,01
One Way						0,001
Anova						

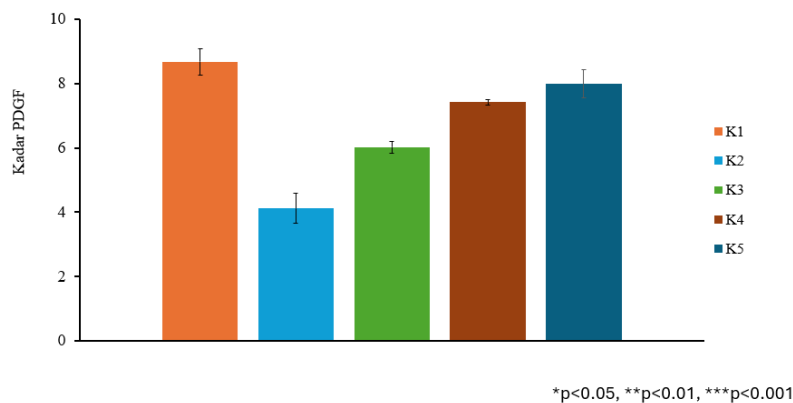
Data kadar PDGF yang diperoleh dari lima kelompok (K1 hingga K5) menunjukkan variasi yang signifikan dalam konsentrasinya. Kelompok K1 memiliki kadar PDGF tertinggi, yaitu $8,68 \pm 0,40$ pg/mL, diikuti oleh K5 dengan $7,99 \pm 0,44$ pg/mL, dan K4 dengan $7,42 \pm 0,09$ pg/mL. Kelompok K3 memiliki kadar yang lebih rendah, yaitu $6,01 \pm 0,18$ pg/mL, sedangkan kadar PDGF terendah ditemukan pada kelompok K2 dengan $4,12 \pm 0,47$ pg/mL.

Uji statistik Shapiro-Wilk yang dilakukan untuk mengevaluasi distribusi data menunjukkan bahwa data kadar PDGF pada semua kelompok memiliki distribusi normal ($p > 0,05$). Namun, analisis homogenitas varians menggunakan Levene test menunjukkan bahwa varians data antar kelompok tidak homogen ($p < 0,05$). Hasil analisis ini kemudian dilanjutkan dengan analisis perbedaan kadar PDGF antar kelompok dilakukan menggunakan One-Way ANOVA, yang memberikan hasil signifikan secara statistik ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada kadar PDGF antar kelompok.

Tabel 5.4. Perbedaan rerata kadar PDGF antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0,001
	K3	0,001
	K4	0,004
	K5	0,168
K2	K3	0,001
	K4	0,001
	K5	0,001
K3	K4	0,001
	K5	0,001
K4	K5	0,224

Berdasarkan data kadar PDGF yang memiliki beda nyata setelah uji uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji Post Hoc Tamhane, karena data bersifat normal, namun tidak homogen. Data hasil uji post hoc Tamhane tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.4. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K4 berbeda signifikan dibanding dengan K1, K2, dan K3 ($p < 0,05$) dan tidak berbeda signifikan dibanding dengan K5 ($p > 0,05$), sedangkan K5 berbeda secara signifikan dengan kelompok K2 dan K3 ($p < 0,05$), dan tidak berbeda secara signifikan dibanding dengan K1 dan K4 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa kadar PDGF K4 dan K5 tidak berbeda, namun hanya kelompok K5 yang memiliki kadar PDGF yang sama dengan kelompok sehat.



Gambar 5.9. Grafik Kadar PDGF

Terdapat pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner dimana dosis tertinggi menghasilkan kenaikan kadar PDGF yang signifikan.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

EH-MSK telah banyak dikaji sebagai alternatif terapeutik yang menjanjikan dalam berbagai kondisi regeneratif dan inflamasi, termasuk dalam pengobatan alopecia-like.⁵³⁻⁵⁵ Salah satu mekanisme utama yang berperan dalam efek terapeutik EH-MSK adalah melalui pengiriman miRNA yang dikandung dalam *exosome*. MiRNA adalah molekul kecil yang dapat mengatur ekspresi gen dengan cara mengikat mRNA target, menghambat translasi, atau menyebabkan degradasi mRNA. Beberapa miRNA yang dikandung dalam EH-MSK, seperti miR-122 dan miR-221, terbukti memiliki peran penting dalam mengatur jalur biologis yang berkaitan dengan pengaturan kadar TGF- β dan PDGF.^{56,57}

miR-122 adalah salah satu miRNA yang paling banyak diteliti dalam konteks regenerasi jaringan dan pengendalian inflamasi. Penelitian

menunjukkan bahwa miR-122 dapat mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam pengaturan fibrosis dan peradangan. Dalam konteks alopecia, miR-122 dapat menstimulasi jalur TGF- β , yang berperan dalam modulasi respons inflamasi dan pengaturan proliferasi sel.^{56,57} TGF- β memiliki peran utama dalam penghambatan aktivasi sel T pro-inflamasi, yang sering terlibat dalam kerusakan folikel rambut.^{58,59} Dengan meningkatkan kadar miR-122, EH-MSC dapat memicu produksi TGF- β , yang selanjutnya dapat membantu menurunkan reaksi inflamasi dan merangsang proses reparasi pada jaringan kulit yang rusak, termasuk folikel rambut.⁶⁰⁻⁶²

Selain itu, miR-221 juga memainkan peran penting dalam pengaturan PDGF.⁶³ MiR-221 dapat meningkatkan ekspresi PDGF melalui pengaturan jalur proliferasi sel dan angiogenesis. Protein PDGF sendiri berperan dalam proses perbaikan jaringan dan regenerasi folikel rambut, dengan cara merangsang pembentukan pembuluh darah dan meningkatkan suplai darah ke area yang rusak.^{64,65} Peningkatan kadar miR-221 dalam EH-MSC dapat mempercepat proses regenerasi folikel rambut dengan merangsang produksi PDGF, yang pada gilirannya dapat memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh alopecia dan mempercepat pertumbuhan rambut.⁶³⁻⁶⁵

Melalui mekanisme ini, miR-122 dan miR-221 yang terkandung dalam EH-MSC berfungsi sebagai mediator yang penting dalam meningkatkan kadar TGF- β dan PDGF.⁶⁰⁻⁶⁵ Kedua protein ini memiliki peran kunci dalam pengaturan respons imun dan regenerasi jaringan, yang sangat relevan dalam pengobatan alopecia-like. TGF- β dan PDGF adalah dua protein

yang memiliki peran penting dalam proses peradangan dan regenerasi jaringan. Kadar TGF- β yang lebih tinggi dikaitkan dengan peningkatan proses reparatif pada jaringan kulit, termasuk pengaturan folikel rambut. TGF- β berfungsi dalam pengaturan respons imun, penghambatan proliferasi sel T, serta pemeliharaan homeostasis jaringan, yang sangat relevan dalam mengatasi kondisi alopecia-like, yang ditandai dengan penurunan pertumbuhan rambut akibat kerusakan folikel. Di sisi lain, PDGF berperan dalam proses proliferasi sel mesenkimal dan juga dalam perbaikan jaringan kulit yang rusak, termasuk pembentukan pembuluh darah dan penyembuhan luka. Peningkatan kadar PDGF dapat mempercepat regenerasi folikel rambut dengan meningkatkan pasokan oksigen dan nutrisi pada jaringan yang terlibat.^{60–65}

Pada penelitian ini, pemberian EH-MSC dengan dosis 100 μ g dan 200 μ g pada tikus model alopecia-like bertujuan untuk mengevaluasi efeknya terhadap kadar TGF- β dan PDGF serta hubungan kedua parameter ini dengan regulasi imun dan perkembangan alopecia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis 200 μ g EH-MSC dapat meningkatkan kadar TGF- β dan PDGF secara signifikan hingga mencapai kadar yang setara dengan tikus sehat. Sementara itu, dosis 100 μ g hanya ada perubahan dalam peningkatan kadar kedua protein tersebut, yang mengindikasikan bahwa dosis 100 μ g dapat juga digunakan untuk efek terapeutik.

Peningkatan kadar TGF- β yang signifikan pada kelompok tikus yang diberikan 200 μ g EH-MSC menunjukkan bahwa dosis tersebut berhasil

mengaktifkan jalur-jalur biologis yang berperan dalam proses regenerasi kulit dan pertumbuhan rambut, yang selanjutnya berhubungan dengan pengurangan gejala alopecia. TGF- β berperan penting dalam penghambatan aktivitas sel T pro-inflamasi, seperti CD8 dan CD4, yang dalam kondisi alopecia-like cenderung teraktivasi dan memperburuk kerusakan folikel rambut.^{62,66-68} Penurunan aktivitas CD8 dan CD4 ini menunjukkan bahwa EH-MSC dapat membantu menekan peradangan yang berkontribusi pada alopecia.^{58,69-73}

Sementara itu, kadar PDGF yang meningkat juga berhubungan dengan peningkatan regenerasi jaringan kulit dan folikel rambut. PDGF memiliki peran dalam pembentukan jaringan ikat dan angiogenesis, yang membantu meningkatkan suplai darah ke folikel rambut. Proses ini dapat mempercepat regenerasi dan mendukung pertumbuhan rambut baru pada tikus model alopecia. Selain itu, PDGF juga berfungsi dalam memperbaiki defisiensi dalam pembentukan kolagen, yang sangat penting dalam memperbaiki kerusakan folikel rambut akibat peradangan kronis.⁶⁰⁻⁶⁵

Pemberian EH-MSC pada dosis 100 μ g dan 200 μ g juga dapat mempengaruhi keseimbangan Treg (Regulatory T cells), yang memainkan peran penting dalam mengontrol respons imun tubuh. Peningkatan aktivitas Treg dapat berkontribusi pada pengaturan sistem imun untuk menghindari serangan terhadap folikel rambut, yang sangat relevan dalam pengobatan alopecia, yang merupakan gangguan autoimun. Dengan meningkatkan jumlah

Treg, EH-MSC berpotensi memperbaiki gangguan autoimun pada alopecia-like dengan mengurangi reaksi imun yang merusak folikel rambut.

Pemberian dosis 100 μg dapat meningkatkan kadar TGF- β dan PDGF namun, dosis 200 μg EH-MSC lebih efektif dalam meningkatkan kadar TGF- β dan PDGF dibandingkan dengan dosis 100 μg karena dosis yang lebih tinggi mengandung lebih banyak *exosome*, yang membawa berbagai molekul bioaktif seperti miR-122 dan miR-221. Molekul-molekul ini berperan penting dalam merangsang ekspresi gen yang mengatur regenerasi jaringan dan pengendalian peradangan. MiR-122 berperan dalam meningkatkan produksi TGF- β , yang mengurangi peradangan dengan menurunkan aktivitas sel imun pro-inflamasi, sementara miR-221 berfungsi dalam merangsang produksi PDGF, yang berperan dalam perbaikan folikel rambut dan pembentukan pembuluh darah.^{60–65}

Dosis 200 μg EH-MSC yang lebih tinggi meningkatkan produksi TGF- β dan PDGF lebih signifikan, yang mempercepat proses regenerasi folikel rambut pada model alopecia-like. Peningkatan kadar kedua protein ini membantu menurunkan kerusakan folikel rambut, memperbaiki suplai darah dan merangsang perbaikan jaringan kulit. Selain itu, dosis yang lebih tinggi juga dapat meningkatkan jumlah sel Treg yang mengendalikan respons imun, mengurangi kerusakan folikel rambut akibat peradangan. Oleh karena itu, dosis 200 μg EH-MSC lebih efektif dalam mengatasi alopecia-like dengan meningkatkan kadar TGF- β dan PDGF secara signifikan.^{58,69–73}

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis 100 μg dapat meningkatkan kadar TGF- β dan PDGF namun, dosis 200 μg EH- MSC lebih meningkatkan kadar TGF- β dan PDGF secara signifikan, yang berhubungan langsung dengan regulasi sistem imun melalui penurunan aktivitas sel CD8 dan CD4 serta peningkatan jumlah Treg. Hal ini mendukung potensi EH- MSC sebagai terapi yang efektif dalam mengatasi alopecia-like dengan memodulasi respons imun dan meningkatkan regenerasi folikel rambut. Penurunan peradangan dan perbaikan jaringan yang difasilitasi oleh peningkatan kadar PDGF dan TGF- β diharapkan dapat menjadi dasar untuk pengembangan terapi berbasis EH- MSC dalam pengobatan alopecia.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi EH-MSC secara subcutan terhadap peningkatan kadar TGF- β dan PDGF pada tikus jantan galur Wistar model alopecia-like menunjukkan hal-hal berikut:

- a. Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) EH-MSC dosis 100 μ g dan 200 μ g terhadap peningkatan kadar TGF- β pada tikus model alopecia-like dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- b. Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) EH-MSC dosis 100 μ g dan 200 μ g terhadap peningkatan kadar PDGF pada tikus model alopecia-like dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

- a. Studi yang akan datang diharapkan untuk mengukur kadar, ekspresi protein intraseluler, dan ekspresi mRNA IL-10 setelah dilakukan injeksi EH-MSC pada tikus model alopecia-like.
- b. Melakukan uji klinis fase 1 pada manusia yang bertujuan untuk mengevaluasi keamanan, tolerabilitas, dosis, serta efek farmakokinetik dan farmakodinamik dari EH-MSC.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ntshingila S, Oputu O, Arowolo AT, Khumalo NP. Androgenetic alopecia: An update. Vol. 13, JAAD International. 2023. p. 150–8.
2. Żeberkiewicz M, Rudnicka L, Malejczyk J. Immunology of alopecia areata. Vol. 45, Central European Journal of Immunology. 2021. p. 325–33.
3. Liang Y, Tang X, Zhang X, Cao C, Yu M, Wan M. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Carrying MiR-122-5p Antagonize the Inhibitory Effect of Dihydrotestosterone on Hair Follicles by Targeting the TGF- β 1/SMAD3 Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
4. Qu Q, Zhou Y, Shi P, Du L, Fan Z, Wang J, et al. Platelet-rich plasma for androgenic alopecia: A randomized, placebo-controlled, double-blind study and combined mice model experiment. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20(10):3227–35.
5. Pan Q, Wang Y, Lan Q, Wu W, Li Z, Ma X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorate hypoxia/reoxygenation-injured ECs via transferring MicroRNA-126. *Stem Cells Int.* 2019;2019.
6. Sani H, Ogunbiyi Oa, George A, Okoro O. Prevalence and pattern of alopecia in secondary and tertiary institutions in Ibadan. *Sub-Saharan African J Med.* 2016;3(3):148.
7. Thiers BH. Distinguishing Androgenetic Alopecia From Chronic Telogen Effluvium When Associated in the Same Patient: A Simple Noninvasive Method. *Yearb Dermatology Dermatologic Surg.* 2006;2006:170–1.
8. Sy N, Mastacouris N, Strunk A, Garg A. Overall and Racial and Ethnic Subgroup Prevalences of Alopecia Areata, Alopecia Totalis, and Alopecia Universalis. *JAMA Dermatology.* 2023;159(4):419–23.
9. Martora F, Vastarella M, Fattore D, Patri A, Fabbrocini G, Cantelli M. Oral Minoxidil for Chemotherapy-Induced Alopecia. *Ski Appendage Disord.* 2022;8(6):508–10.
10. Suchonwanit P, Thammarucha S, Leerunyakul K. Minoxidil and its use in hair disorders: A review. Vol. 13, *Drug Design, Development and Therapy.* 2019. p. 2777–86.
11. Liu H, Kuang H, Wang Y, Bao L, Cao W, Yu L, et al. MSC-derived exosomes protect auditory hair cells from neomycin-induced damage via autophagy regulation. *Biol Res.* 2024;57(1).
12. Ha DH, Kim HK, Lee J, Kwon HH, Park GH, Yang SH, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells.* 2020.
13. Zhang C, Zhang X, Zhang M. Exosomes Derived from Bone Marrow-

- Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSC) Protect Submandibular Glands in Diabetic Rats. *J Biomater Tissue Eng*. 2021;11(11):2168–73.
14. Chen YX, Deng ZH, Xue-Gao, Qiang-Du, Juan-Yin, Chen GH, et al. Exosomes derived from mesenchymal stromal cells exert a therapeutic effect on hypoxia-induced pulmonary hypertension by modulating the YAP1/SPP1 signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2023;168.
 15. Gentile P, Garcovich S. Autologous activated platelet-rich plasma (AA-PRP) and non-activated (A-PRP) in hair growth: a retrospective, blinded, randomized evaluation in androgenetic alopecia. *Expert Opin Biol Ther*. 2020;20(3):327–37.
 16. Li Y, Wang G, Wang Q, Zhang Y, Cui L, Huang X. Exosomes Secreted from Adipose-Derived Stem Cells Are a Potential Treatment Agent for Immune-Mediated Alopecia. *J Immunol Res*. 2022.
 17. Bak DH, Choi MJ, Kim SR, Lee BC, Kim JM, Jeon ES, Oh W, Lim ES, Park BC, Kim MJ, Na J, Kim BJ. 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. Czerniak P, Bartusik-Aebischer D, Aebischer D. Transforming growth factors (TGFs). In: *The Biochemical Guide to Proteins*. 2023. p. 7–10.
 19. Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB. Matrix control of transforming growth factor- β function. *J Biochem*. 2012;152(4):321–9.
 20. Ding Z, Jiang M, Qian J, Gu D, Bai H, Cai M, et al. Role of transforming growth factor- β in peripheral nerve regeneration. Vol. 19, *Neural Regeneration Research*. 2024. p. 380–6.
 21. Lu GQ, Wu ZB, Chu XY, Bi ZG, Fan WX. An investigation of crosstalk between Wnt/ β -catenin and transforming growth factor- β signaling in androgenetic alopecia. *Med (United States)*. 2016;95(30).
 22. Gaspar NK. DHEA and frontal fibrosing alopecia: Molecular and physiopathological mechanisms. *An Bras Dermatol*. 2016;91(6):776–80.
 23. Shin H, Yoo HG, Inui S, Itami S, Kim IG, Cho AR, et al. Induction of transforming growth factor-beta 1 by androgen is mediated by reactive oxygen species in hair follicle dermal papilla cells. *BMB Rep*. 2013;46(9):460–4.
 24. Lichtenberger BM, Mastrogiannaki M, Watt FM. Epidermal β -catenin activation remodels the dermis via paracrine signalling to distinct fibroblast lineages. *Nat Commun*. 2016;7.
 25. Cummins DM, Chaudhry IH, Harries M. Scarring alopecias: Pathology and an update on digital developments. Vol. 9, *Biomedicines*. 2021.
 26. Chen Y, Zhou L, Ding Y, Yang X, Jing J, Wu X, et al. Kartogenin regulates

- hair growth and hair cycling transition. *Int J Med Sci.* 2022;19(3):537–45.
27. Bhat AA, Moglad E, Bansal P, Kaur H, Deorari M, Thapa R, et al. Pollutants to pathogens: The role of heavy metals in modulating TGF- β signaling and lung cancer risk. Vol. 256, *Pathology Research and Practice.* 2024.
 28. Hong SH, Kang M, Lee KS, Yu K. High fat diet-induced TGF- β /Gbb signaling provokes insulin resistance through the tribbles expression. *Sci Rep.* 2016;6.
 29. Hermetet F, Buffière A, Aznague A, Pais de Barros JP, Bastie JN, Delva L, et al. High-fat diet disturbs lipid raft/TGF- β signaling-mediated maintenance of hematopoietic stem cells in mouse bone marrow. *Nat Commun.* 2019;10(1).
 30. The Effect of Oral Polymeric Diet Enriched With TGF-beta 2 (Modulen) on Clinical Response and Mucosal Healing in Adult Patients With Newly Diagnosed Crohn's Disease. *Case Med Res.* 2020.
 31. Papadopoulos N, Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. Vol. 62, *Molecular Aspects of Medicine.* 2018. p. 75–88.
 32. Reigstad LJ, Sande HM, Fluge Ø, Bruland O, Muga A, Varhaug JE, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C, a PDGF family member with a vascular endothelial growth factor-like structure. *J Biol Chem.* 2003;278(19):17114–20.
 33. Cao R, Bråkenhielm E, Li X, Pietras K, Widenfalk J, Östman A, et al. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- α and - β receptors. *FASEB J.* 2002;16(12):1575–83.
 34. Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. Vol. 14, *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 2003. p. 91–8.
 35. Folestad E, Kunath A, Wågsäter D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. Vol. 62, *Molecular Aspects of Medicine.* 2018. p. 1–11.
 36. Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. Vol. 614, *Gene.* 2017. p. 1–7.
 37. Cecerska-Heryć E, Goszka M, Serwin N, Roszak M, Grygorcewicz B, Heryć R, et al. Applications of the regenerative capacity of platelets in modern medicine. Vol. 64, *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 2022. p. 84–94.
 38. Sarah E. Millar, Molecular Mechanisms Regulating Hair Follicle Development, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 118, Issue 2, 2002.
 39. Mifude C, Kaseda K. PDGF-AA-induced filamentous mitochondria benefit dermal papilla cells in cellular migration. *Int J Cosmet Sci.* 2015;37(3):266

40. Gleason PE, Jones JA, Regan JS, Salvas DB, Eble JN, Lamph WW, et al. Platelet derived growth factor (PDGF), androgens and inflammation: Possible etiologic factors in the development of prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1993;149(6):1586–92.
41. Zhao Q, Zhang J, Chen L, Xing Y. Research Progress of PDGF Promoting Wound Repair. *Med J Peking Union Med Coll Hosp*. 2023;14(6):1289–95.
42. Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA, Collins T. Nuclear factor- κ B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest*. 1995;96(2):1169–75.
43. Salabei JK, Cummins TD, Singh M, Jones SP, Bhatnagar A, Hill BG. PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress. *Biochem J*. 2013;451(3):375–88.
44. Arsita C, Nasihun T, Husaana A. Uvb dose optimization for phototherapy in vitamin D deficiency: Profile analysis of vitamin D, TNF- α , vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet derived growth factor (PDGF) in wistar rats. *Bangladesh J Med Sci*. 2020;19(4):749–54.
45. Ahmadi K, Asgharzadeh F, Mohammadpour-Asl S, Ayari F, Rahbar F, Motazakker M, et al. In vitro Pretreatment with Zinc Alleviates the Adverse Effects of Tetrahydrocannabinol on Cultured Mouse Sertoli Cells: Role of Anti-apoptotic and Antioxidant Activities. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets*. 2023;23(13):1611–20.
46. York K, Meah N, Bhoyrul B, Sinclair R. Treatment review for male pattern hair-loss. Vol. 21, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2020. p. 603–12.
47. An T, Chen Y, Tu Y, Lin P. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: Application and Challenges. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2021.
48. Novello S, Pellen-Mussi P, Jeanne S. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles as cell-free therapy: Perspectives in periodontal regeneration. *J Periodontal Res [Internet]*. 2021 Jun;56(3):433–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jre.12866>
49. Casado-Díaz A, Quesada-Gómez JM, Dorado G. Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8(March):1–19.
50. Kazi T, Nagata A, Nakagawa T, Matsuzaki T, Inui S. Dermal Papilla Cell-Derived Extracellular Vesicles Increase Hair Inductive Gene Expression in Adipose Stem Cells via β -Catenin Activation. *Cells*. 2022;11(2).
51. Zhang X, Bao P, Zheng Q, Chu M, Liang C, Guo X, et al. Comparative Analysis of mRNA and miRNA Expression between Dermal Papilla Cells

and Hair Matrix Cells of Hair Follicles in Yak. *Cells*. 2022;11(24).

52. Winkler I, Engler JB, Vieira V, Bauer S, Liu YH, Di Liberto G, et al. MicroRNA-92a-CPEB3 axis protects neurons against inflammatory neurodegeneration. *Sci Adv*. 2023;9(47).
53. Liao Z, Zheng R, Shao G. Mechanisms and application strategies of miRNA-146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review). Vol. 51, *International Journal of Molecular Medicine*. 2023.
54. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol*. 2010;190(6):1079–91.
55. Choi JS, Yoon HI, Lee KS, Choi YC, Yang SH, Kim IS, et al. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release*. 2016;
56. Ruvolo PP, Jacamo R, Ruvolo VR, Burks JK, Battula VL, McQueen T, et al. Exosomes Mediate Communication Between the Microenvironment and Leukemic Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2012;120(21):3469–3469.
57. Qu Q, Pang Y, Zhang C, Liu L, Bi Y. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit vein graft intimal hyperplasia and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1).
58. Kang K, Ma R, Cai W, Huang W, Paul C, Liang J, et al. Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote Cardioprotection via Akt Signaling Pathway following Myocardial Infarction. *Stem Cells Int*. 2015;2015.
59. González-Cubero E, González-Fernández ML, Gutiérrez-Velasco L, Navarro-Ramírez E, Villar-Suárez V. Isolation and characterization of exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*. 2021;238(5):1203–17.
60. Widayati RE. PENGARUH EKSTRAK ALOE VERA TOPIKAL TERHADAP EKSPRESI MMP-1 DAN RASIO KOLAGEN TIPE I DAN III Studi Eksperimental pada Kulit Mencit Balb/c yang dipapar radiasi UVB. Universitas Islam Sultan Agung; 2017.
61. Xiaoxiang Wang, Yinghui Liu, Jia He, Jingru Wang, Xiaodong Chen, Ronghua Yang, Regulasi jalur sinyal pada sel induk folikel rambut, *Luka Bakar & Trauma* , Volume 10, 2022.
62. Garg S, Manchanda S. Platelet-rich plasma-an 'Elixir' for treatment of alopecia: personal experience on 117 patients with review of literature. *Stem Cell Investig*. 2017.

63. Tomita Y, Akiyama M, Shimizu H. PDGF isoforms induce and maintain anagen phase of murine hair follicles. *J Dermatol Sci*. 2006.
64. Ren, Jie, Sun, Jingxuan, Li, Zhenghui, Zhao, Yi, Tuan, Hsiaoan, The Impact of Growth Factors in Platelet-Rich Plasma Combination Therapy for M. Harries, AE Macbeth, S. Holmes, WS Chiu, WR Gallardo, M. Nijher, S. de. 2024.
65. Lusignan, C. Tziotzios, AG Messenger, Epidemiologi alopecia areata: studi kohort berbasis populasi dalam perawatan primer di Inggris, *British Journal of Dermatology* , Volume 186, Edisi 2, 1 Februari 2022, Halaman 257–265, Androgenic Alopecia, *Dermatologic Therapy*, 2024, 8452387, 7 pages, 2024.
66. Pratt CH, King LE Jr, Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. Alopecia areata. *Nat Rev Dis Primers*. 2017.
67. Jessika, C., Putra, A., & Sumarawati, T. (2024). Therapeutic Potential of Secretome from Hypoxic-Mesenchymal Stem Cell (SH-MSC) in Regulating PDGF and IL-1 β Gene Expression in Fluconazole-Related Alopecia. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 16(1)
68. Sarah E. Millar, Molecular Mechanisms Regulating Hair Follicle Development, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 118, Issue 2, 2002.
69. Sven Müller-Röver, Kerstin Foitzik, Ralf Paus, Bori Handjiski, Carina van der Veen, Stefan Eichmüller, Ian A. McKay, Kurt S. Stenn, A Comprehensive Guide for the Accurate Classification of Murine Hair Follicles in Distinct Hair Cycle Stages, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 117, Issue 1, 2001.
70. Moench R, Gasser M, Nawalaniec K, Grimmig T, Ajay AK, de Souza LCR, Cao M, Luo Y, Hoegger P, Ribas CM, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Lissner R, Hsiao LL, Waaga-Gasser AM. Platelet-derived growth factor (PDGF) cross-signaling via non-corresponding receptors indicates bypassed signaling in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2022.
71. Nestor MS, Ablon G, Gade A, Han H, Fischer DL. Treatment options for androgenetic alopecia: Efficacy, side effects, compliance, financial considerations, and ethics. *J Cosmet Dermatol*. 2021 Dec;20(12):3759-3781.
72. Singh S, Muthuvel K. Practical Approach to Hair Loss Diagnosis. *Indian J Plast Surg*. 2021.
73. Harries, M., Macbeth, AE, Holmes, S., Chiu, WS, Gallardo, WR, Nijher, M., de Lusignan, S., Tziotzios, C. dan Messenger, Epidemiologi alopecia areata: studi kohort berbasis populasi dalam perawatan primer di In Isabelle Paggioli, Jeremy Moss, 2022.
74. Alopecia Areata: Case report and review of pathophysiology and treatment

with Jak inhibitors, *Journal of Autoimmunity*, Volume 133, 2022

75. Maharani S. Potensi Pemberian Vitamin D Topikal pada Alopecia Areata. 2021;03(01):1638–44.
76. Toena HT, Danarti R. Diagnosis Alopecia Areata Pada Anak: Kasus Serial. *Cermin Dunia Kedokt.* 2022;49(April):214–8
77. Gilhar A, Etzioni A, Paus R. "Alopecia Areata." *New England Journal of Medicine*. Volume 366. No. 16. 2012
78. Legiawati L, Suseno LS, Sitohang IBS, Pratama AI. Hair disorder in dr. Cipto Mangunkusumo cosmetic dermatology and venereology outpatient clinic of Jakarta, Indonesia: A socio-demographic and clinical evaluation. *Dermatol Reports.* 2022;14(3).
79. Marahatta S, Agrawal S, Adhikari BR. Psychological Impact of Alopecia Areata. *Dermatol Res Pract.* 2020 Dec 24; 2020: 8879343
80. Hibino T, Nishiyama T. "Role of TGF-beta2 in the human hair cycle." *J Dermatol Sci.* 2004 Jul;35(1):9-18.
81. Philp D, Scopelliti A, et al. "PDGF-BB mediates hair follicle dermal papilla cell growth and restoration through Akt signaling pathway." *J Investig Dermatol.* 2010;130(4):1137-1145.
82. Thompson GR 3rd, Krois CR, Affolter VK, Everett AD, Varjonen EK, Sharon VR, Singapuri A, Dennis M, McHardy I, Yoo HS, Fedor DM, Wiederhold NP, Aaron PA, Gelli A, Napoli JL, White SD. Examination of Fluconazole-Induced Alopecia in an Animal Model and Human Cohort. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Jan 29;63(2): e01384-18.
83. Benitez LL, Carver PL. Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. *Drugs.* 2019 Jun;79(8):833-853.
84. Du F, Li J, Zhang S, Zeng X, Nie J, Li Z. Oxidative stress in hair follicle development and hair growth: Signalling pathways, intervening mechanisms and potential of natural antioxidants. *J Cell Mol Med.* 2024 Jun;28(12): e18486.
85. Choi, Y.M., Choi, S.Y., Kim, H. et al. TGFβ family mimetic peptide promotes proliferation of human hair follicle dermal papilla cells and hair growth in C57BL/6 mice. *biomed dermatol* 2, 23 (2018).
86. Rezza A, Sennett R, Tanguy M, Clavel C, Rendl M. PDGF signalling in the dermis and in dermal condensates is dispensable for hair follicle induction and formation. *Exp Dermatol.* 2015 Jun;24(6):468-70.
87. Wu, X., Li, T., Jiang, R. et al. Targeting MHC-I molecules for cancer: function, mechanism, and therapeutic prospects. *Mol Cancer* 22, 194.2023.

88. Yu Q, Dong Y, Wang X, Su C, Zhang R, Xu W, Jiang S, Dang Y, Jiang W. Pharmacological induction of MHC-I expression in tumor cells revitalizes T cell antitumor immunity. *JCI Insight*. 2024 Aug 6;9(17): e177788.
89. Voskoboinik, I., Whisstock, J. & Trapani, J. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15, 388–400 2015.
90. Faisal S, Toraih EA, Atef LM, Hassan R, Fouad MM, Al Ageeli E, Fawzy MS, Abdalla HA. MicroRNA-17-92a-1 Host Gene (MIR17HG) Expression Signature and rs4284505 Variant Association with Alopecia Areata: A Case-Control Study. *Genes (Basel)*. 2022 Mar 12;13(3):505.
91. El-Refaie, A.M. & Sorour, N.E. & Mustafa, Amany & El-Shimi, Ola & Mohammed, S. S. (2018). Study of Skin Expression of MicroRNA-146a in Patients with Alopecia Areata. *Benha Journal of Applied Sciences*. 3. 1-3. 10.21608/bjas.2018.191138.
92. Li K, Sun Y, Liu S, Zhou Y, Qu Q, Wang G, Wang J, Chen R, Fan Z, Liu B, Li Y, Mao X, Hu Z, Miao Y. The AR/miR-221/IGF-1 pathway mediates the pathogenesis of androgenetic alopecia. *Int J Biol Sci*. 2023 Jun 26;19(11):3307-3323.
93. Paul S, Licona-Vázquez I, Serrano-Cano FI, Frías-Reid N, Pacheco-Dorantes C, Pathak S, Chakraborty S, Srivastava A. Current insight into the functions of microRNAs in common human hair loss disorders: a mini review. *Hum Cell*. 2021 Jul;34(4):1040-1050.
94. Pratt, C., King, L., Messenger, A. et al. Alopecia areata. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17011.2017.
95. Olayinka JJT, Richmond JM. Immunopathogenesis of alopecia areata. *Curr Res Immunol*. 2021 Feb 6; 2:7-11.
96. Gilhar A, Etzioni A, Paus R. Alopecia areata. *N Engl J Med*. 2012 Apr 19;366(16):1515-25.
97. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. et al. NF-κB signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023.2017.
98. Putra, Agung (2019) Basic Molecular Stem Cell. Unissula Press, Semarang. ISBN 978-623-7097-06-8.
99. Todorova LN, Abadjieva TI. Platelet-Rich Plasma in Alopecia areata: A Case Report with a Mini Review of Literature. *Cureus*. 2023 May 9;15(5): e38751. doi: 10.7759/cureus.38751. PMID: 37303356; PMCID: PMC10248741.
100. Ahn D, Kim H, Lee B, Hahm DH. Psychological Stress-Induced Pathogenesis of Alopecia Areata: Autoimmune and Apoptotic Pathways. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 20;24(14):11711. doi: 10.3390/ijms241411711. PMID: 37511468; PMCID: PMC10380371.

101. Altunisik N., Ucuz I., Turkmen D. Psychiatric basics of alopecia areata in pediatric patients: evaluation of emotion dysregulation, somatization, depression, and anxiety levels. *J Cosmet Dermatol.* 2022;21(2):770-775. 10.1111/jocd.14122
102. Vélez-Muñiz RDC, Peralta-Pedrero ML, Jurado-Santa Cruz F, Morales-Sánchez MA. Psychological Profile and Quality of Life of Patients with Alopecia Areata. *Skin Appendage Disord.* 2019 Aug;5(5):293-298. doi: 10.1159/000497166. Epub 2019 Mar 20. PMID: 31559253; PMCID: PMC6751425.
103. Aşkın Ö, Koyuncu Z, Serdaroğlu S. Association of alopecia with self-esteem in children and adolescents. *Int J Adolesc Med Health.* 2020 Aug 24;34(5):315-318. doi: 10.1515/ijamh-2020-0100. PMID: 32829314.
104. Zhang M, Zhang N. Quality of life assessment in patients with alopecia areata and androgenetic alopecia in the People's Republic of China. *Patient Prefer Adherence.* 2017 Jan 27; 11: 151-155. doi: 10.2147/PPA.S121218. PMID: 28203058; PMCID: PMC5293494.
105. Toussi A, Barton VR, Le ST, Agbai ON, Kiuru M. Psychosocial and psychiatric comorbidities and health-related quality of life in alopecia areata: A systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2021 Jul;85(1):162-175. doi: 10.1016/j.jaad.2020.06.047. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32561373; PMCID: PMC8260215.
106. Sindaco P, Pandey H, Isabelle C, Chakravarti N, Brammer JE, Porcu P, Mishra A. The role of interleukin-15 in the development and treatment of hematological malignancies. *Front Immunol.* 2023 Apr 20;14: 1141208. doi: 10.3389/fimmu.2023.1141208. PMID: 37153603; PMCID: PMC10157481.
107. Tyagi, Kashish & Kapoor, Sheilly & Mohapatra, Ishani & Sharma, Komal. (2021). PRP therapy in chronic diffuse alopecia areata – A case report. *IP Indian Journal of Clinical and Experimental Dermatology.* 7. 363-366. 10.18231/j.ijced.2021.068.
108. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmipathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.* 2008 Jul 15;112(2):295-307. doi: 10.1182/blood-2007-07-103697. Epub 2008 Mar 10. PMID: 18332228.
109. Hawke LG, Mitchell BZ, Ormiston ML. TGF- β and IL-15 Synergize through MAPK Pathways to Drive the Conversion of Human NK Cells to an Innate Lymphoid Cell 1-like Phenotype. *J Immunol.* 2020 Jun 15;204(12):3171-3181. doi: 10.4049/jimmunol.1900866. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32332109.

110. Ma S, Tang T, Wu X, Mansour AG, Lu T, Zhang J, Wang LS, Caligiuri MA, Yu J. PDGF-D-PDGFR β signaling enhances IL-15-mediated human natural killer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Jan 18;119(3):e2114134119. doi: 10.1073/pnas.2114134119. PMID: 35027451; PMCID: PMC8784126.
111. Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*. 2007 Dec;220:199-213. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00565.x. PMID: 17979848; PMCID: PMC2614905.
112. Morgan, M., Liu, Zg. Crosstalk spesies oksigen reaktif dan pensinyalan NF- κ B. *Cell Res* 21, 103–115 (2011). <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
113. Peng HY, Lucavs J, Ballard D, Das JK, Kumar A, Wang L, Ren Y, Xiong X, Song J. Metabolic Reprogramming and Reactive Oxygen Species in T Cell Immunity. *Front Immunol*. 2021 Mar 31;12:652687. doi: 10.3389/fimmu.2021.652687. PMID: 33868291; PMCID: PMC8044852.
114. Yarosz EL, Chang CH. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-mediated Immunity and Disease. *Immune Netw*. 2018 Feb 22;18(1):e14. doi: 10.4110/in.2018.18.e14. PMID: 29503744; PMCID: PMC5833121.
115. Jin J, Hu H, Li HS, Yu J, Xiao Y, Brittain GC, Zou Q, Cheng X, Mallette FA, Watowich SS, Sun SC. Noncanonical NF- κ B pathway controls the production of type I interferons in antiviral innate immunity. *Immunity*. 2014 Mar 20;40(3):342-54. doi: 10.1016/j.immuni.2014.02.006. PMID: 24656046; PMCID: PMC3983709.
116. McDonald PP, Russo MP, Ferrini S, Cassatella MA. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood*. 1998 Dec 15;92(12):4828-35. PMID: 9845550.