

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HIPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (EH-MSCs)
TERHADAP KADAR TNF- α DAN VEGF
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus model *Alopecia-like* yang
diinduksi Fluconazol)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister
(S2)



Magister Ilmu Biomedik

Siska Marlina Sulistami

MBK.2322010417

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2025**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HIPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (EH-MSCs)
TERHADAP KADAR TNF- α DAN VEGF
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus model
Alopecia-like yang diinduksi Fluconazol)**

Disusun oleh

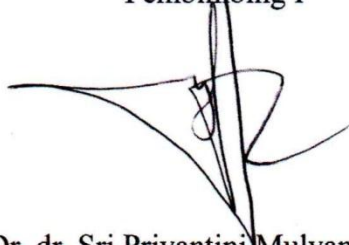
Siska Marlina Sulistami

MBK2322010417

Yang dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 20 Januari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

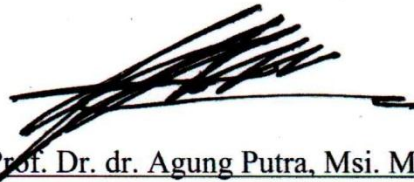
Menyetujui,

Pembimbing I



Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp.A
NIP. 210.105.097

Pembimbing II



Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi. Med
NIP. 210.199.050

Mengetahui,

Ketua program studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, SpB. FINACS
NIP. 210.123.160

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



(Siska Marlina Sulistami)

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan izin-NYA, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian tesis yang berjudul “**Pengaruh pemberian *Exosome Mesenchymal Stem Cell (EH-MSc)* terhadap kadar TNF- α dan VEGF (Studi eksperimental In Vivo Pada Tikus model *Alopecia-like* yang diinduksi Fluconazol)**”

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

Dengan demikian, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih yang mendalam 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, SpB FINACS sekaligus selaku penguji I.
4. Dr. dr. Sri Priyanti Mulyani, Sp.A atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing pertama.

5. Prof. DR. dr. Agung Putra, Msi. Med selaku pembimbing kedua, yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis
6. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku penguji II yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
7. Dr. dr. Chodijah, M.Kes selaku penguji III yang telah memberikan banyak saran saran dalam penyelesaian tesis.
8. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
9. Segenap staf administrasi progam Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
10. Kedua orang tua dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doanya.
11. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Dengan keterbatasan pengalaman, pengetahuan, serta referensi yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki banyak kekurangan dan memerlukan pengembangan lebih lanjut agar benar-benar bermanfaat. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk penyempurnaan tesis ini, serta sebagai masukan bagi penulis dalam penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa depan.

Akhir kata, Penulis menyampaikan harapan agar karya ini dapat memberikan manfaat yang berarti, baik bagi pengembangan ilmu pengetahuan

maupun sebagai referensi bagi penelitian di masa mendatang. . Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukan dan memberikan kontribusi positif terhadap kemajuan ilmu yang berkelanjutan

Semarang, 17 Januari 2025

Penulis



Siska Marlina Sulistami



ABSTRAK

Latar Belakang : *Alopecia* merupakan kondisi hilangnya rambut dari daerah yang normalnya ditumbuhi rambut.^{1,2,3} TNF- α memainkan peranan dalam kejadian *alopecia* dimana diketahui TNF- α menghambat proliferasi, menyebabkan vakuolisasi sel-sel matriks di bulbus folikel rambut, menyebabkan penurunan ukuran matriks serta menyebabkan disorganisasi melanosit folikel dan diferensiasi abnormal serta keratinisasi sel-sel prekortikal dan selubung akar bagian dalam.^{49,50}

Sementara VEGF dilaporkan dapat mengurangi kerontokan rambut dengan membentuk pembuluh darah baru dan meningkatkan sirkulasi darah di sekitar folikel rambut.³⁸ Exosome MSC dapat memulai jalur sinyal Wnt/ β -catenin, mengantarkan faktor pertumbuhan, dan mengatur peradangan yang dapat semakin memperkuat potensinya sebagai terapi yang efektif untuk kerontokan rambut.²⁷

Tujuan : Mengetahui pengaruh pemberian EH-MSCs terhadap kadar TNF α dan VEGF jaringan kulit tikus galur Wistar model *alopecia-like*.

Metode : Penelitian eksperimental Post Test Only Control Group Design. Subyek penelitian 30 ekor tikus wistar jantan dibagi dalam 5 kelompok. Tikus kelompok K1 tikus sehat, K2 tikus *alopecia-like* yang diberi injeksi NaCl 0,9%, K3 tikus *alopecia-like* yang diberi injeksi Minoxidil 5%, K4 tikus *alopecia-like* dengan pemberian EH-MSCs dosis 100 μ L, dan tikus *alopecia-like* dengan pemberian EH-MSCs dosis 200 μ L. Pada hari ke 14 pasca perlakuan, dilakukan pemeriksaan kadar TNF- α dan VEGF pada kulit tikus.

Hasil Penelitian : Hasil uji Shapiro Wilk dan uji levene menunjukkan data terdistribusi normal namun tidak homogen. Pada uji One Way Anova kelompok K4 dan K5 tikus *alopecia-like* didapatkan kadar TNF- α dan VEGF mengalami perubahan yang signifikan ($p < 0.05$) dibandingkan kelompok kontrol.

Kesimpulan : Pemberian EH EH-MSCs dosis 100 μ L dan 200 μ L memberikan perubahan bermakna pada penurunan kadar TNF- α dan peningkatan kadar VEGF pada tikus model *alopecia-like* dibandingkan tikus kontrol.

Kata Kunci : Alopecia-like, TNF- α , VEGF, EH-MSCs

ABSTRACT

Background: Alopecia is defined as the loss of hair from areas normally covered with hair.^{1,2,3} TNF- α is known to be a very potent inhibitor of proliferation and causes vacuolization of matrix cells in the hair follicle bulb and a decrease in matrix size and causes disorganization of follicle melanocytes and abnormal differentiation and keratinization of precortical cells and inner root sheath.^{49,50} While VEGF has been reported to reduce hair loss by forming new blood vessels and increasing blood circulation around the hair follicles.³⁸ MSC exosomes can initiate the Wnt/ β -catenin signaling pathway, deliver growth factors, and regulate inflammation, which may further strengthen its potential as an effective therapy for hair loss.²⁷

Objective: To determine the effect of EH-MSCs administration on TNF α and VEGF levels in skin tissue of Wistar rats with an alopecia-like model.

Method: Experimental research Post Test Only Control Group Design. The subjects of the study were 30 male Wistar rats divided into 5 groups. Group K1 healthy rats, K2 alopecia-like rats given 0.9% NaCl injection, K3 alopecia-like rats given 5% Minoxidil injection, K4 alopecia-like rats given 100 μ L of EH-MSCs, and alopecia-like rats given 200 μ L of EH-MSCs. On the 14th day after treatment, TNF- α and VEGF levels were examined in the rat skin.

Results: The results of the Shapiro Wilk test and Levene test showed that the data were normally distributed but not homogeneous. In the One Way Anova test of groups K4 and K5 of alopecia-like mice, TNF- α and VEGF levels changed significantly ($p < 0.05$) compared to the control group.

Conclusion: Administration of EH EH-MSCs at doses of 100 μ L and 200 μ L provided significant changes in decreasing TNF- α levels and increasing VEGF levels in alopecia-like model mice.

Keywords: Alopecia-like, TNF- α , VEGF, EH-MSCs

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Penelitian	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan khusus	4
1.4. Manfaat penelitian	5
1.4.1. Manfaat Teoritis	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. TNF- α	8
2.1.1. Definisi.....	8
2.1.2. Peran TNF- α pada <i>Alopecia</i>	9
2.2. VEGF	10
2.2.1. Definisi.....	10
2.2.2. Peran VEGF pada <i>Alopecia</i>	11

2.3.	<i>Alopecia</i>	12
2.3.1.	<i>Alopecia Areata</i>	12
2.3.2.	<i>Alopecia</i> Jenis lain.....	12
2.4.	Fluconazol.....	13
2.4.1.	Definisi	13
2.4.2.	Peran Fluconazol Dalam <i>Alopecia</i>	14
2.5.	<i>Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell</i> (EH-MSCs)	15
2.5.1.	Definisi	15
2.5.2.	Kandungan Exosome MSC	16
2.5.3.	Metode Isolasi Exosome MSC	18
2.6.	Pengaruh <i>Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell</i> terhadap <i>Alopecia</i>	20
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		21
3.1.	Kerangka Teori.....	21
3.2.	Kerangka Konsep.....	25
3.3.	Hipotesis	25
BAB IV METODE PENELITIAN		26
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	26
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	27
4.2.1.	Variabel Penelitian	27
4.2.2.	Definisi Operasional.....	27
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	28
4.3.1.	Subyek penelitian	28
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	29
4.4.	Teknik Pengambilan Sampel Penelitian.....	29
4.5.	Besar Sampel	30
4.6.	Alat dan Bahan.....	31
4.6.1.	Alat Penelitian	31
4.6.2.	Bahan Penelitian.....	31
4.7.	Cara Penelitian	32
4.7.1.	<i>Ethical Clearance</i>	32

4.7.2. Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> ...	32
4.7.3. Proses Hipoxia	33
4.7.4. Pembuatan Exosome Hipoxia MSCs	33
4.7.5. Pembuatan <i>Alopecia</i> dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	34
4.7.6. Metode Validasi.....	35
4.7.7. Terminasi dan Pengambilan Jaringan.....	37
4.7.8. Preparasi Sampel.....	37
4.7.9. Analisis ELISA	38
4.8. Tempat dan Waktu Penelitian.....	39
4.9. Analisa Data.....	40
4.10. Alur Penelitian	41
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	42
5.1. Hasil Penelitian	42
5.1.1. Hasil Validasi EH-MSC	42
5.1.2. Hasil Validasi <i>Alopecia-like</i>	44
5.1.3. Kadar TNF- α	46
5.1.4. Kadar VEGF.....	48
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	50
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	55
6.1. Kesimpulan	55
6.2. Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN.....	71

DAFTAR SINGKATAN

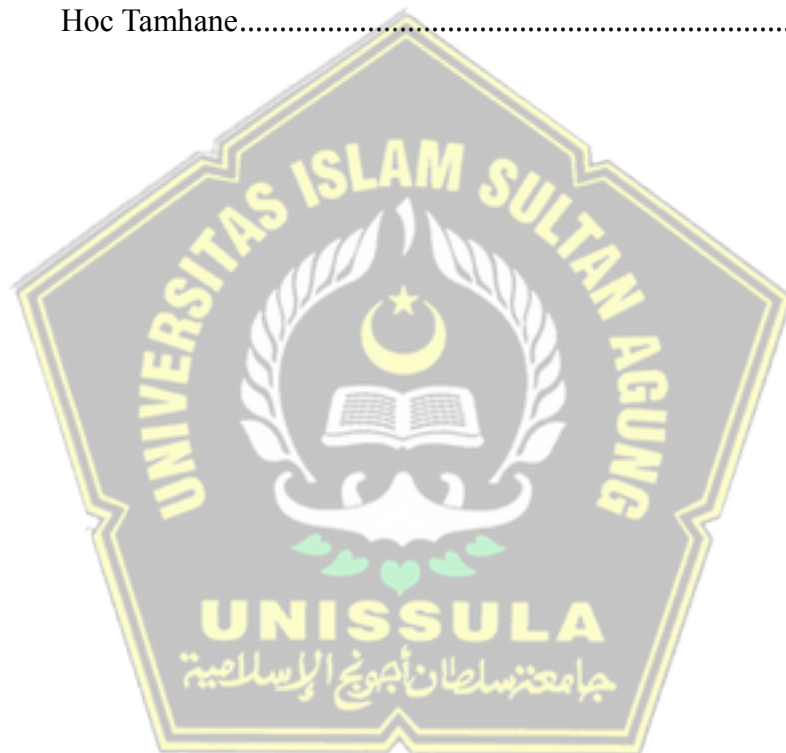
AA	: Alopecia Areata
AGA	: Alopecia Androgenik
AU	: Alopecia Universalis
ADSC-Exos	: Adipose-Derived Stem Cell Exosomes
DHT	: Dihydrotestosterone
EH-MSC	: Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell
EGF	: epidermal growth factor
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FGF	: Fibroblast Growth Factor
Flk-1	: fetal liver kinase 1
hUCB-MSC	: Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell
IFN- δ	: Interferon Gamma
HE	: Hemotoksilin Eosin
IGF	: Insulin-Like Growth Factor
IGFBP-1	: Insulin-like growth factor binding protein-1
IKK	: Inhibitor kappa β Kinase
IKB	: inhibitor I kappa B
IL- β	: Interleukin beta
IL-1 α	: Interrleukin 1-alpha
IL-10	: Interluekin-10
KDR	: kinase insert-domain containing receptor
MAPK/ERK	: Mitogen Activated Protein Kinase / Extracellular-Signal-Regulated Kinase
miRNA	: Micro Ribonucleic Acid
miR-22	: mikro RNA 22
miR-147b	; mikro RNA 147b
MSC	: Mesenchymal Stem Cell
NF- κ B.	: nuclear factor kappa beta
PCA	: Primer Cicatrical Alopecia

PEG	: <i>Polyethylene Glycol</i>
PI3K/AKT	: <i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PlGF	: <i>Placental Growth Factor</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNA	: <i>Ribo Nucleotida Acid</i>
sTNF- α	: <i>Surface tumor necrosis factor alpha</i>
TACE	: <i>Tumour necrosis factor (TNF)-alpha converting enzyme</i>
TE	: <i>Telogen Effluvium</i>
TFF	: <i>Tangential flow filtration</i>
Th	: <i>T Helper</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necroting Factor Alpha</i>
tmTNF- α	: <i>transmembrane tumor necrosis factor alpha</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular Nedotheial Growth Factor Resecptor</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas penelitian.....	6
Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Kadar TNF- α	47
Tabel 5.2. Perbedaan rerata kadar TNF- α antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane.....	48
Tabel 5.3. Data Hasil Analisis Kadar VEGF	49
Tabel 5.4. Perbedaan rerata kadar VEGF antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane.....	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Jalur pensinyalan faktor nekrosis tumor alfa (TNF- α) umum dari TNFR1 dan TNFR2	8
Gambar 2.2.	Jalur pensinyalan VEGF dan beberapa antagonis representatif.	10
Gambar 2.3.	Peran Exosome MCS dalam <i>Alopecia</i>	20
Gambar 3.1.	Representasi skema untuk sumbu AR/miR-221/IGF1 yang mengatur jalur MAPK dan jalur PI3K/AKT.....	23
Gambar 3.2.	Kerangka Teori	24
Gambar 3.3.	Kerangka Konsep	25
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian	26
Gambar 4.2.	Isolasi MSC dan Pembuatan Exosome.....	34
Gambar 4.3.	Alur Penelitian.....	41
Gambar 5.1.	Morfologi MSC. (A) Isolasi MSCs yang berbentuk <i>spindle-like</i> ...	42
Gambar 5.2.	Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin red pada pembesaran 400x (A) dan Adiposit pada pewarnaan oil red o pada pembesaran 400x (B).....	43
Gambar 5.3.	Hasil Analisis Kadar Exosome menggunakan marker CD63 dan CD9.....	44
Gambar 5.4.	Validasi Makroskopis <i>Alopecia-like</i>	45
Gambar 5.5.	Validasi mikroskopis Tikus sehat dan <i>Alopecia-like</i> menggunakan HE.	45
Gambar 5.6.	Grafik Kadar TNF- α pada jaringan kulit setelah pemberian EH-MSCs	48
Gambar 5.7.	Grafik Kadar VEGF pada jaringan kulit setelah pemberian EH-MSCs.	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearence</i>	71
Lampiran 2. Surat Keterangan Selesai Penelitian	72
Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan	75
Lampiran 4. Data Penelitian.....	77



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alopecia, sebuah kondisi dimana terjadi hilangnya rambut dari daerah yang normalnya ditumbuhi rambut, diketahui terjadi pada 0,1-0,2% populasi di seluruh dunia dan menyebabkan efek negatif terhadap psikologis pada individu yang terdampak.¹⁻⁶ Pasien dengan *alopecia* memiliki peningkatan risiko gangguan kesehatan mental seperti perasaan sedih, malu dan isolasi sosial.^{7,8} Penelitian yang dilakukan J Y Koo *et al* menunjukkan bahwa penderita *alopecia areata* (AA) memiliki prevalensi episode depresi mayor, gangguan kecemasan umum, fobia sosial, dan gangguan paranoid yang jauh lebih besar dibandingkan populasi yang sehat.⁹ Hal yang sama terlihat pada anak penderita AA dimana mereka menunjukkan lebih banyak gejala kecemasan dan depresi serta tingkat harga diri yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.^{10,11} Penelitian lain yang melibatkan pasien dengan *alopecia androgenik* (AGA) dan *alopecia sikatrikial primer* (PCA) memperlihatkan adanya pengurangan kualitas hidup yang signifikan berkaitan dengan kondisi ini.^{12,13}

Mengingat beratnya efek psikologis yang ditanggung penderita *Alopecia*, penyediaan treatment yang efektif sangat penting. Saat ini, pengobatan lini pertama untuk *alopecia* adalah steroid intralesi/topikal, finasteride oral, atau minoksidil topikal.^{14,15} Steroid bekerja dengan memperbaiki disregulasi imun dan inflamasi yang biasanya terjadi pada kasus AA, sementara finasteride dapat berfungsi sebagai agen antiandrogenik untuk mengatasi patologi hormonal pada

pasien dengan AGA.¹⁶⁻¹⁸ Minoksidil topikal memiliki aktivitas antiandrogenik, sekaligus dapat meningkatkan aliran darah ke kulit kepala.^{19,20} Sayangnya, treatment yang tersedia menunjukkan hasil yang tidak memuaskan. Diketahui, obat-obat ini harus aplikasi minimal 12 bulan untuk memperlihatkan hasil dan perlu digunakan secara terus menerus agar manfaatnya tetap dapat dirasakan.^{14,21} Sementara itu, efek samping penggunaan jangka panjangnya juga tidak menyenangkan seperti iritasi, hipertrikosis, hilangnya libido, disfungsi ereksi, penurunan volume ejakulasi, dan ginekomastia.²²⁻²⁵

Pengobatan regeneratif berbasis stem cell kemudian dikembangkan sebagai alternatif untuk mengatasi masalah yang dihadapi pengobatan konvensional *alopecia*. Penelitian Owczarczyk-Saczonek *et al* menunjukkan bahwa transplantasi Mesenchymal Stem Cell (MSC) dari darah tali pusat, jaringan adiposa, sumsum tulang dan folikel dapat meregenerasi folikel rambut di kulit tanpa menimbulkan efek samping apa pun.^{24,25} Tidak berhenti di sana, treatment bebas sel menggunakan exosome kemudian dikembangkan. Dibandingkan dengan MSC, exosome yang berasal dari sel punca memiliki banyak keuntungan, seperti non-imunogenisitas, non-toksisitas infus, akses mudah, pengawetan mudah, dan bebas dari potensi tumorigenik dan masalah etika. Exosome dapat mewarisi efek terapeutik yang sama dari sel induknya seperti sel punca embrionik dan sel punca dewasa melalui pengiriman vertikal pluripotensi atau multipotensinya.²⁶ Diketahui, exosome MSC mengandung berbagai protein, seperti faktor pertumbuhan dan sitokin, yang dapat merangsang pertumbuhan rambut dan memodulasi siklus pertumbuhan rambut.²⁷ Selain itu, exosome MSC

juga mengandung miRNA yang dapat mempengaruhi ekspresi gen yang terlibat dalam regulasi siklus rambut.²⁷⁻²⁹

Meskipun terdengar menjanjikan, penelitian mengenai cara kerja dan faktor yang dipengaruhi oleh exosome beserta berapa dosis yang harus digunakan untuk memperoleh hasil terbaik masih sangat terbatas, khususnya untuk exosome yang berasal dari tali pusat. Padahal MSC yang berasal dari tali pusat lebih mudah diekstraksi, lebih muda dan naif, tidak memerlukan pencocokan jaringan karena insiden penyakit graft-host lebih sedikit sehingga bisa digunakan untuk orang lain.³⁰

TNF- α adalah sitokin proinflamasi yang juga memengaruhi respons non-imun dalam jaringan seperti proliferasi dan diferensiasi sel.³¹ Studi *in vitro* telah menunjukkan bahwa TNF- α , bersama dengan IL-1 α dan IL- β , menyebabkan vakuolisasi sel matriks, keratinisasi abnormal pada bulbus folikel dan selubung akar bagian dalam, serta gangguan melanosit folikel dan keberadaan granula melanin dalam papila dermal.³² Eksperimen dalam folikel rambut manusia yang dikultur oleh Hoffmann *et al.* menunjukkan bahwa TNF- α sepenuhnya membatalkan pertumbuhan rambut.³³ Selain itu, TNF- α menginduksi pembentukan folikel rambut seperti tongkat, mirip dengan morfologi katagen dari bulbus rambut.³⁴ Kasumagic-Halilovic E *et al* juga menemukan bahwa klon sel-T yang melepaskan sejumlah besar IFN- γ dan/atau TNF- α menghambat pertumbuhan keratinosit.³⁵

Faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) dikenal sebagai salah satu mediator terpenting dalam regenerasi vaskular dimana VEGF bekerja

meningkatkan permeabilitas vaskular, menginduksi proliferasi sel endotel, dan merangsang pembentukan kapiler.^{36,37} VEGF telah dilaporkan dapat mengurangi kerontokan rambut dengan membentuk pembuluh darah baru dan meningkatkan sirkulasi darah di sekitar folikel rambut.³⁸ Studi Kiichiro Yano *et al* menunjukkan bahwa ekspresi berlebih dari VEGF pada keratinosit folikel mengakibatkan percepatan pertumbuhan kembali rambut dan peningkatan ukuran folikel rambut, memberikan bukti langsung pertama bahwa peningkatan angiogenesis dapat meningkatkan pertumbuhan rambut dan juga menyebabkan peningkatan ketebalan rambut.³⁹

1.2. Rumusan Penelitian

Apakah terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar TNF- α dan VEGF pada Tikus model *alopecia-like* yang diinduksi fluconazol?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum yang ingin dicapai penelitian ini adalah membuktikan pengaruh pemberian EH-MSC terhadap kadar TNF- α dan VEGF pada model tikus galur Wistar dengan *alopecia like* yang diinduksi paparan *fluconazol*

1.3.2. Tujuan khusus

1.3.2.1. Membuktikan perbedaan kadar TNF- α antara kelompok Tikus yang diberikan Exosome hipoxia MSC dosis 100 $\mu\text{g/kgbb}$ dan 200 $\mu\text{g/kgbb}$ dengan kelompok control pada tikus model *alopecia-like* yang diinduksi

fluconazol.

- 1.3.2.2. Membuktikan perbedaan kadar VEGF antara kelompok Tikus yang diberikan Exosome hipoxia MSC dosis 100 µg/kgbb dan 200 µg/kgbb dengan kelompok kontrol pada tikus model *alopecia-like* yang diinduksi fluconazol.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat yang ingin didapat dari penelitian ini adalah memberikan bukti ilmiah peran *Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar TNF-α dan VEGF pada Tikus model *alopecia like* yang diinduksi *fluconazol*.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan yang berguna bagi masyarakat mengenai kegunaan EH-MSC untuk mengobati *alopecia*



1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Thompson III GR, Krois CR, Affolter VK, Everett AD, Katarina Varjonen E, Sharon VR, <i>et al</i> ⁴⁰	Examination of Fluconazole-Induced Alopecia in an Animal Model and Human Cohort	Eksperi mental <i>in vivo</i>	Pemberian <i>fluconazol</i> harian di hari ke 7 meningkatkan fase telogen
Guiyue Wang, <i>et al</i> ⁴¹	Treatmen of Androgenetic Alopecia by Exosomes Secreted from Hair Papilla Cells and the Intervention Effect of LTF	Eksperi mental <i>in vivo</i>	Terjadi regenerasi rambut signifikan dan terjadi peningkatan ekspresi VEGF dan AKT1 serta penurunan ekspresi Caspase3
Ch Huh <i>et al.</i> ⁴²	Exosome for Hair Regeneration: from Bench to Bedside	Eksperi mental <i>in vivo</i>	Exosome dapat merangsang proliferasi folikel rambut, mempercepat transisi dari fase telogen ke anagen, dan melindungi sel-sel folikel rambut dari ROS dan androgen serta peningkatan kepadatan rambut dan ketebalan rata-rata dalam studi <i>in vivo</i> .
Jinyan Wu, <i>et al</i> ⁴⁴	Adipose-Derived Stem Cell Exosomes Promoted Hair Regeneration	Eksperi mental <i>in vitro</i>	Jumlah rambut yang diregenerasi dalam kelompok ADSC-Exos lebih tinggi daripada kelompok control. Selain itu, ditemukan bahwa jaringan kulit dalam kelompok ADSC-Exos memiliki ekspresi VEGF dan VEGF lebih tinggi serta Growth factor 1 Beta yang lebih rendah daripada kelompok kontrol.
Yanqiao Li <i>et al.</i> ²⁸	Exosomes Secreted from Adipose-Derived Stem Cells Are a Potential	Eksperi mental <i>in vitro</i>	Terapi ADSC-Exos meningkatkan pertumbuhan kembali rambut dengan regulasi jalur pensinyalan

Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
	Treatmen Agent for Immune-Mediated Alopecia		miR-22, Wnt / β -catenin, dan TNF- α pada alopecia yang dimediasi imun.
Dong Ho Bak <i>et al.</i> ⁴⁵	Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells Engineered to Overexpress Growth Factors Accelerate Outcomes in Hair Growth	Eksperi mental <i>in vitro</i>	HUCB-MSCs meningkatkan kelangsungan hidup dan protein untuk induksi rambut secara <i>in vitro</i> . hUCB-MSC menginduksi faktor pertumbuhan rambut seperti <i>Insulin-like growth factor binding protein-1</i> (IGFBP-1) dan <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) Secara keseluruhan, hUCB- MSC meningkatkan pertumbuhan rambut melalui mekanisme parakrin.

Berdasarkan data pada tabel 1, didapatkan bahwa belum terdapat penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian exosome sel punca mesenkimal hipoxia secara injeksi pada dosis 100 μ L/kgBB dan 200 μ L/kgBB terhadap penurunan kadar penurunan kadar TNF- α dan peningkatan kadar VEGF pada model tikus Wistar dengan alopecia like yang diinduksi secara oral menggunakan fluconazol sehingga penelitian ini layak untuk dilakukan.

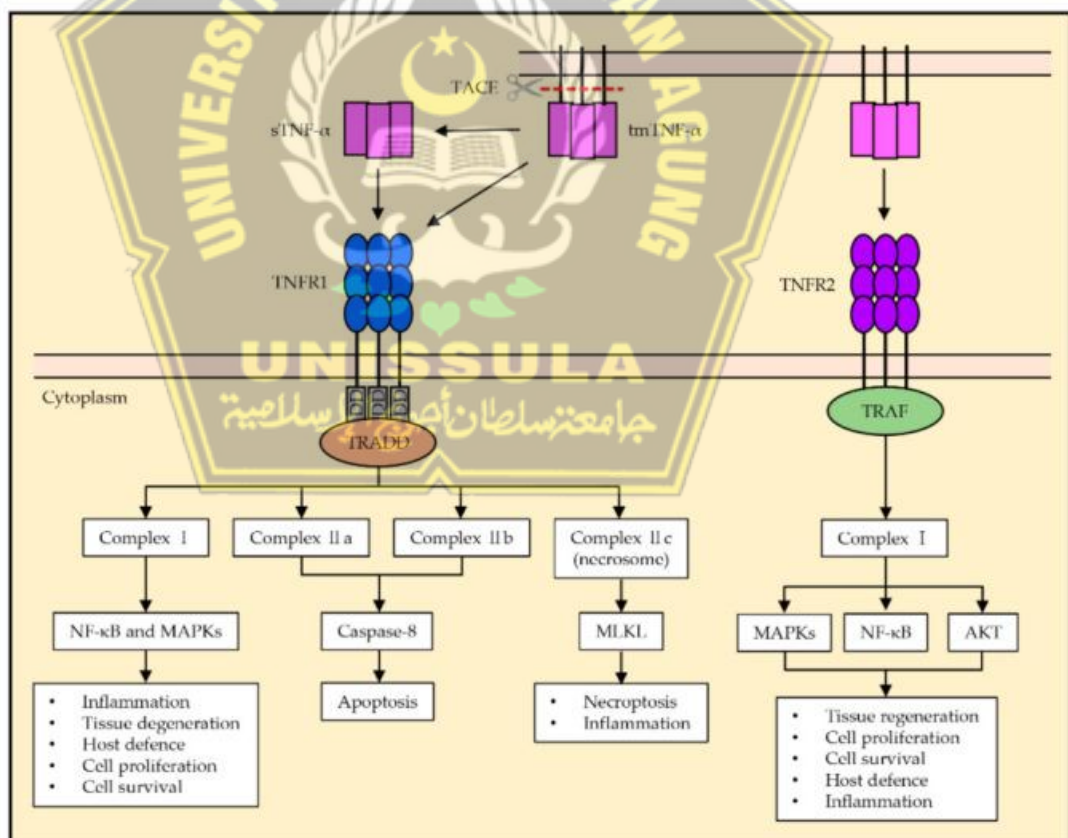
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TNF- α

2.1.1. Definisi

Secara struktural, TNF- α merupakan protein homotrimer yang terdiri dari 157 asam amino, yang sebagian besar dihasilkan oleh makrofag yang teraktivasi, limfosit T, dan sel pembunuh alami. Sitokin ini memiliki efek pleiotropik pada berbagai jenis sel, terutama bekerja memicu berbagai molekul inflamasi, termasuk sitokin dan kemokin lainnya.⁴⁶



Gambar 2.1. Jalur pensinyalan faktor nekrosis tumor alfa (TNF- α) umum dari TNFR1 dan TNFR2⁴⁸

TNF- α memiliki 2 bentuk, yakni transmembran (tmTNF- α) dan yang larut (sTNF- α), dimana tmTNF- α adalah bentuk prekursor yang harus diaktivasi oleh enzim pengubah TNF- α (TACE), untuk dilepaskan sebagai sTNF- α .⁴⁷ Secara umum, TNF- α mengikat reseptornya, terutama TNFR1 dan TNFR2, dan kemudian mengirimkan sinyal molekuler untuk fungsi biologis seperti peradangan dan kematian sel.⁴⁸

2.1.2. Peran TNF- α pada Alopecia

TNF- α yang disintesis dalam keratinosit epidermis diketahui sebagai penghambat proliferasi yang sangat kuat. Lebih jauh, penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa TNF- α , bersama dengan interleukin 1 α (IL-1 α) dan IL1- β , menyebabkan vakuolisasi sel-sel matriks di dalam bulbus folikel rambut dan penurunan ukuran matriks dan juga menyebabkan disorganisasi melanosit folikel dan diferensiasi abnormal serta keratinisasi sel-sel prekortikal dan selubung akar bagian dalam pada pasien dengan alopecia areata.^{49,50}

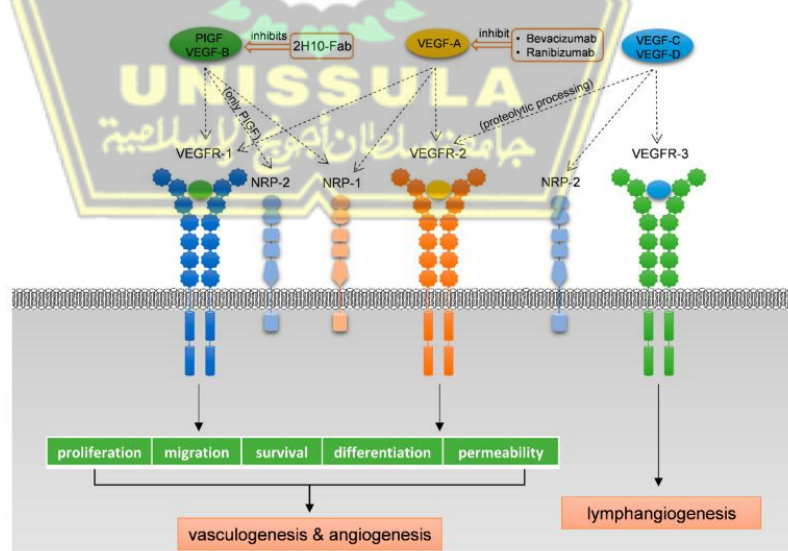
Teraki *et al.* melaporkan bahwa kadar serum TNF- α pada pasien dengan AA secara signifikan lebih tinggi dibandingkan pada pasien dengan alopecia universalis (AU).⁵¹ Selain itu, Lis *et al.* menemukan bahwa tingkat serum reseptor TNF- α Tipe I meningkat secara signifikan pada pasien AA dibandingkan dengan kontrol sehat.⁵²

Penelitian Mahé *et al* menemukan adanya peradangan folikel mikroskopis dalam patogenesis alopecia androgenik yang dinamakan mikroinflamasi, karena prosesnya melibatkan perjalanan yang lambat, halus, dan lamban, berbeda dengan proses inflamasi dan destruktif dalam alopecia jaringan parut inflamasi klasik.⁵³

2.2. VEGF

2.2.1. Definisi

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah keluarga glikoprotein homodimerik yang secara struktural terkait dengan faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit (VEGF), yang mencakup faktor pertumbuhan plasenta (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan VEGF-E. Keluarga protein VEGF ini mengikat secara selektif dengan afinitas yang berbeda ke setidaknya lima reseptor yang berbeda. Tiga di antaranya termasuk dalam superfamili reseptor tirosin kinase dan disebut reseptor VEGF-1 (VEGFR-1), juga disebut Flt-1 (tirosin kinase 1 mirip *fms*), VEGFR-2, juga disebut KDR (kinase insert-domain containing receptor) pada manusia, dan Flk-1 (fetal liver kinase 1) pada hewan pengerat, masing-masing, serta VEGFR-3, juga disebut Flt-4. Reseptor keempat dan kelima adalah neuropilin-1 dan neuropilin-2.⁵⁴



Gambar 2.2. Jalur pensinyalan VEGF dan beberapa antagonis representatif.⁵⁵

2.2.2. Peran VEGF pada Alopecia

Mengingat fakta bahwa terdapat kapiler yang kaya dalam papila selama pertumbuhan rambut, tetapi kapiler tersebut menghilang selama transisi ke periode istirahat, diperkirakan bahwa pertumbuhan pembuluh darah berhubungan dengan pertumbuhan rambut dan dengan demikian VEGF terlibat dalam pertumbuhan rambut. VEGF juga dilaporkan dapat mengurangi kerontokan rambut dengan meningkatkan sirkulasi darah dan pembentukan pembuluh darah baru di sekitar folikel.^{55,56}

VEGF telah dilaporkan dapat mengurangi kerontokan rambut dengan membentuk pembuluh darah baru dan meningkatkan sirkulasi darah di sekitar folikel rambut.³⁸

Penelitian yang dilakukan Back menunjukkan bahwa VEGF dapat mempromosikan pertumbuhan rambut.⁵⁶ Studi Kiichiro Yano *et al* menunjukkan bahwa ekspresi berlebih dari VEGF pada keratinosit folikel mengakibatkan percepatan pertumbuhan kembali rambut dan peningkatan ukuran folikel rambut, memberikan bukti langsung pertama bahwa peningkatan angiogenesis dapat meningkatkan pertumbuhan rambut dan juga menyebabkan peningkatan ketebalan rambut.³⁹

Penelitian di Rusia yang melibatkan 30 pasien wanita dengan telogen effluvium dan 8 relawan sehat. mengungkapkan bahwa pada wanita dengan telogen effluvium, indikator area relatif ekspresi VEGF dan ekspresi KGF terbukti secara signifikan lebih rendah daripada pada wanita sehat.⁵⁷

2.3. Alopecia

2.3.1. Alopecia Areata

Alopecia areata adalah kondisi yang dimediasi oleh sistem imun yang menyebabkan alopecia tanpa jaringan parut pada kulit kepala dan area tubuh lain yang ditumbuhi rambut. Kondisi ini memengaruhi hingga 2% dari populasi global.⁵⁸ Kondisi ini dapat memengaruhi semua usia, tetapi prevalensinya tampak lebih tinggi pada anak-anak dibandingkan dengan orang dewasa (1,92%, 1,47%).⁵⁹ Insidensi yang lebih tinggi dilaporkan terjadi pada wanita dibandingkan pria, terutama pada pasien dengan penyakit yang muncul pada usia lebih dari 50 tahun.⁶⁰ Disregulasi beberapa jalur yang dimediasi imun telah terlibat dalam perkembangan AA, terutama berkaitan dengan aktivasi sitokin Th1, Th2 dan Th17, dengan sitokin Th1 (IL-2, TNF, IL-12) dan Th17 (IL17 dan IL17E).⁶¹

Alopecia areata ditandai dengan munculnya bercak-bercak kebotakan berbentuk bulat atau oval yang halus dan tidak berwarna di kulit kepala. Ukuran dan lokasi bercak kebotakan ini bisa sangat bervariasi, dari kecil hingga menyebar ke seluruh kulit kepala atau bahkan seluruh tubuh. Pada kasus yang lebih parah, *alopecia areata* dapat berkembang menjadi *alopecia totalis*, di mana seluruh rambut di kulit kepala rontok, atau *alopecia universalis*, yang menyebabkan hilangnya semua rambut di tubuh, termasuk alis, bulu mata, dan rambut tubuh lainnya.⁶²

2.3.2. Alopecia Jenis lain

Alopecia memiliki berbagai bentuk selain *alopecia areata*, masing-masing dengan karakteristik dan penyebab yang berbeda, namun yang paling banyak

ditemukan adalah *alopecia androgenik* dan *telogen effluvium*.

Alopecia pola atau *androgenetik* adalah kelainan yang ditentukan secara genetik akibat respons berlebihan terhadap androgen, yang memengaruhi sekitar 50% pria dan wanita.⁶³ Kondisi ini ditandai dengan hilangnya rambut terminal kulit kepala secara progresif, yang biasanya terjadi setelah pubertas, dengan pola yang khas pada pria dan wanita. Pada pria, kerontokan rambut paling menonjol di daerah ubun-ubun dan frontotemporal, sedangkan wanita cenderung mempertahankan garis rambut frontal mereka sambil mengalami penipisan rambut apikal yang menyebar, yang menyebabkan bagian anterior rambut tampak lebih lebar.⁶⁴⁻⁶⁶

Telogen effluvium (TE) adalah kerontokan rambut yang menyebar, tidak meninggalkan bekas luka, dari kulit kepala yang terjadi sekitar 3 bulan setelah peristiwa pemicu dan biasanya sembuh sendiri, berlangsung selama sekitar 6 bulan. Pada TE, kerontokan rambut biasanya kurang dari 50% dari rambut kulit kepala.⁶⁷⁻⁶⁹

2.4. Fluconazol

2.4.1. Definisi

Fluconazol merupakan suatu hidrofilik dari sintetik triazol, terdapat dalam bentuk oral dan parenteral. Fluconazol termasuk antifungi golongan triazol yang bekerja menghambat sintesis ergosterol pada membran sel jamur dengan cara menghambat sistem enzim sitokrom P-450 14- α -demethylase. Fluconazol bersifat fungistatik. Fluconazol paling efektif terhadap jamur *Candida*, *Coccidioides immitis* dan *Cryptococcus neoformans*. Fluconazolw efektif terhadap spesies

Candida, tetapi memiliki sifat resistan terhadap *Candida krusei* dan *Candida glabrata*.⁷⁰

Penelitian menemukan bahwa fluconazol meningkatkan aktivitas enzimatis ROS. Aktivitas enzimatis tersebut tidak berbeda antara strain yang resisten dan rentan.⁷¹

Fluconazol secara cepat dan sempurna diserap melalui gastrointestinal. Bioavailabilitas oral flukonazol melebihi 90% pada orang dewasa. Konsentrasi puncak plasma dicapai setelah 1 atau 2 jam pemberian oral dengan eliminasi waktu paruh plasma $\pm$ 30 jam (20–50 jam) setelah pemberian oral. Absorbsinya tidak dipengaruhi oleh kadar asam lambung. Metabolisme fluconazol ini terjadi di hepar dan akan diekskresikan melalui urine. Fluconazol bersifat hidrofilik sehingga sangat banyak ditemukan di dalam cairan tubuh juga terkandung dalam keringat dalam konsentrasi tinggi.⁷²

Efek samping yang sering dijumpai adalah masalah gastrointestinal seperti mual, muntah, diare, sakit pada abdomen juga sakit kepala. Efek samping lain yaitu hipersensitivitas hepatotoksik, trombositopenia dan efek pada sistem saraf pusat.⁷⁰

2.4.2. Peran Fluconazol Dalam Alopecia

Papas *et al* pertama kali mengidentifikasi terdapat hubungan antara fluconazol dan alopecia. Diduga bahwa alopecia terkait dengan interaksi yang belum teridentifikasi antara fluconazol dan turunan asam retinoat yang menimbulkan gambaran “retinoid-like” berupa kerontokan rambut, kering pada kulit dan membran mukosa, serta perubahan kuku yang diobservasi pada beberapa

orang yang mendapatkan terapi fluconazol.⁴⁰

Penelitian oleh Thompson *et al* mengenai pengaruh fluconazol terhadap alopecia dilakukan dengan memberikan fluconazol secara acak dengan dosis 35mg/kg/hari pada tikus wistar jantan, dimana didapatkan hasil bahwa fluconazol mencetuskan perubahan folikel rambut dan menyebabkan folikel rambut tersebut masuk pada fase istirahat prematur (telogen effluvium). Hasil ini didapatkan pada tikus yang mendapatkan fluconazol dibandingkan dengan tikus yang tidak mendapatkan fluconazol pada hari ke 21 pemeriksaan. Pemberian fluconazol ini menyebabkan hambatan pada CYP26A1.⁴⁰

2.5. *Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell (EH-MSCs)*

2.5.1. Definisi

Exosome adalah vesikel lipid bilayer bulat dengan diameter berkisar 30-150 nm. Biogenesis exosome melalui serangkaian proses invaginasi membran plasma yang kemudian melepaskan diri. Karenanya, exosome memiliki komponen mirip sel induk dan memberikan efek khusus pada sel penerima yang agak setara dengan efek sel induknya.⁷³⁻⁷⁴

Mesenchymal stem cell (MSC) adalah jenis sel punca multipoten yang mampu berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel seperti adiposit, osteoblas, kondrosit, neuronal, miosit dan β pankreas. International Society of Cellular Therapy menentukan kriteria MSC sebagai berikut: dapat menempel pada plastic cawan kultur, berpotensi diferensiasi menjadi sel adipogenik, kontrogenik dan osteogenik serta mengekspresikan CD105, CD90 dan CD73 tanpa mengekspresikan CD45, CD19, CD79a, CD14, CD11b, HLA-DR dan HLA Class

II Antigen.⁷⁵

Hipoxia adalah kondisi ketika jaringan tidak menerima cukup oksigen, yang dapat berdampak pada berbagai fungsi sel. Meskipun hipoxia umumnya diasosiasikan dengan dampak negatif, kondisi ini justru memberikan manfaat bagi mesenchymal stem cell (MSC). Prakondisi hipoxia MSC dapat meningkatkan potensi proliferasi dan diferensiasi MSC, oleh karena itu, meningkatkan efikasi terapi transplantasi MSC dan melemahkan diferensiasi abnormal.⁷⁶ Anderson *et al.* menganalisis isi protein exosome yang berasal dari MSC yang dikultur dalam kondisi simulasi jaringan iskemik (1% O₂) dan menemukan bahwa exosome ini menunjukkan peningkatan faktor proangiogenik yang bermanfaat untuk pengobatan penyakit iskemik.⁷⁷ Liu *et al.* juga menemukan bahwa dibandingkan dengan exosome yang berasal dari MSC yang dikultur dalam kondisi normoksia, exosome yang berasal dari MSC yang dikultur dalam kondisi hipoxia meningkatkan angiogenesis, proliferasi, dan migrasi yang lebih besar.⁷⁸

Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell (EH-MSCs) merupakan exosome yang dihasilkan dari MSC yang dikultur dalam kondisi hipoxia. Exosome memiliki marker permukaan spesifik yakni CD9, CD63, dan CD81, yang bermanfaat untuk identifikasi dan isolasi.⁷³⁻⁷⁸

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.^{79,80} Selain itu, miRNA-92a dan miRNA-146a memiliki sifat anti-inflamasi yang membantu mengurangi peradangan kulit kepala, yang sering dikaitkan dengan kerontokan rambut.^{81,82}

b. Protein dan Enzim

Exosome MSC mengandung berbagai protein dan enzim yang mendukung regenerasi jaringan dan pertumbuhan sel. Protein seperti Wnt dan VEGF berperan dalam jalur sinyal yang penting untuk siklus pertumbuhan rambut.^{83,84} Wnt, misalnya, terlibat dalam aktivasi fase anagen folikel rambut, sementara VEGF 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.⁸⁵

d. Cytokine dan Growth Factors

Exosome MSC mengandung berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan seperti VEGF, VEGF, dan IGF yang berperan dalam angiogenesis, proliferasi sel, dan penyembuhan luka. VEGF 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.^{86,87}

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. Ultracentrifugasi Diferensial

Metode ini adalah yang paling umum digunakan untuk isolasi exosome. Proses ini melibatkan beberapa tahap centrifugasi 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.⁸⁸

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.⁸⁸

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.⁸⁸

d. Presipitasi Polimer

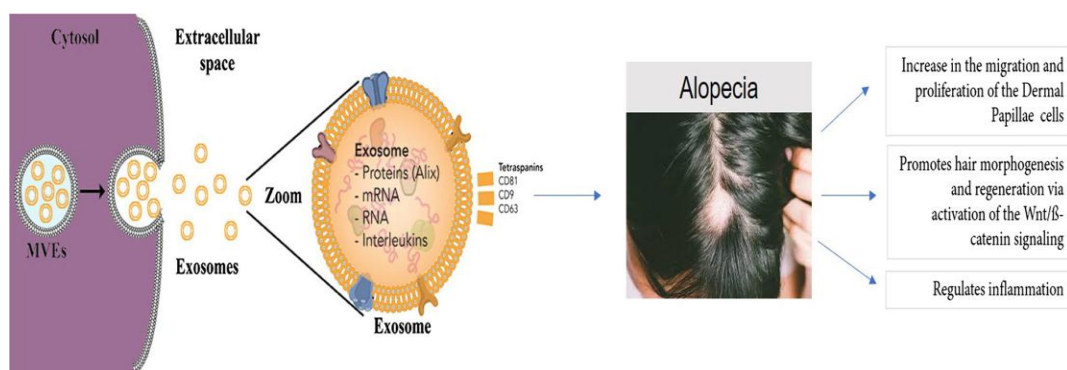
Metode ini melibatkan penggunaan polimer, seperti polyethylene glycol (PEG), yang menginduksi presipitasi exosome dari medium kultur. Polimer ini ditambahkan ke medium kultur dan diinkubasi, kemudian campuran disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk mengendapkan exosome. Metode ini relatif cepat dan sederhana, namun bisa menghasilkan exosome dengan kemurnian yang lebih rendah dibandingkan metode lain.⁸⁸

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.⁸⁸

2.6. Pengaruh Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell terhadap Alopecia

Exosome hypoxia dari *mesenchymal stem cell* mengandung beberapa komponen seperti miRNA, protein, enzim, lipida, sitokin dan *Growth Factors* diantaranya yang berkontribusi dalam mengatasi alopecia.²⁹ Penelitian menunjukkan bahwa exosome MSC dapat memulai jalur sinyal Wnt/ β -catenin, mengantarkan faktor pertumbuhan, dan mengatur peradangan yang dapat semakin memperkuat potensinya sebagai terapi yang efektif untuk kerontokan rambut.²⁷ Selain itu penelitian Exosome terutama dari jaringan adiposa, dapat mengurangi gejala alopecia areata dan merangsang pertumbuhan rambut baru. Studi ini menunjukkan hasil positif dalam meningkatkan kepadatan rambut dan mengurangi area kebotakan.²¹



Gambar 2.3. Peran Exosome MCS dalam Alopecia

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

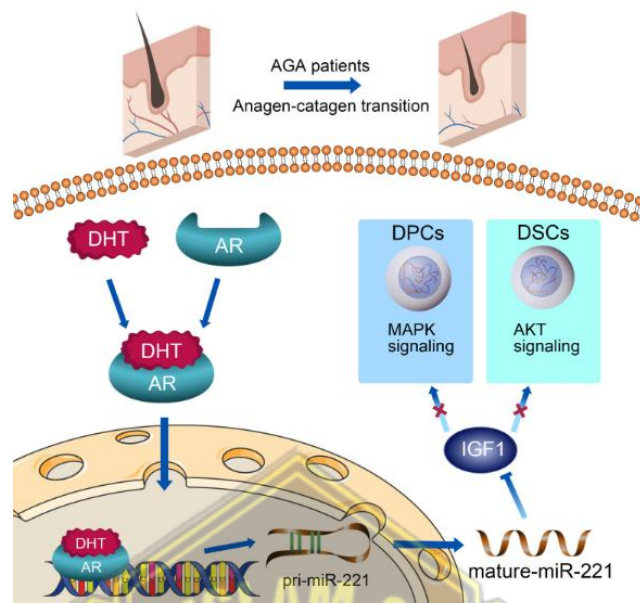
3.1. Kerangka Teori

Fluconazol adalah obat yang digunakan untuk mengatasi infeksi yang disebabkan oleh jamur, seperti kandidiasis, kriptokokosis, dan infeksi lainnya. Obat ini telah diketahui memiliki efek samping berupa alopecia melalui proses peningkatan stres oksidatif pada sel folikel rambut, melalui 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.¹⁰¹

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.^{104,105} Perforin membantu membuka pori pada membran sel target, sementara granzim masuk ke dalam sel dan memicu jalur apoptosis sel.¹⁰⁶

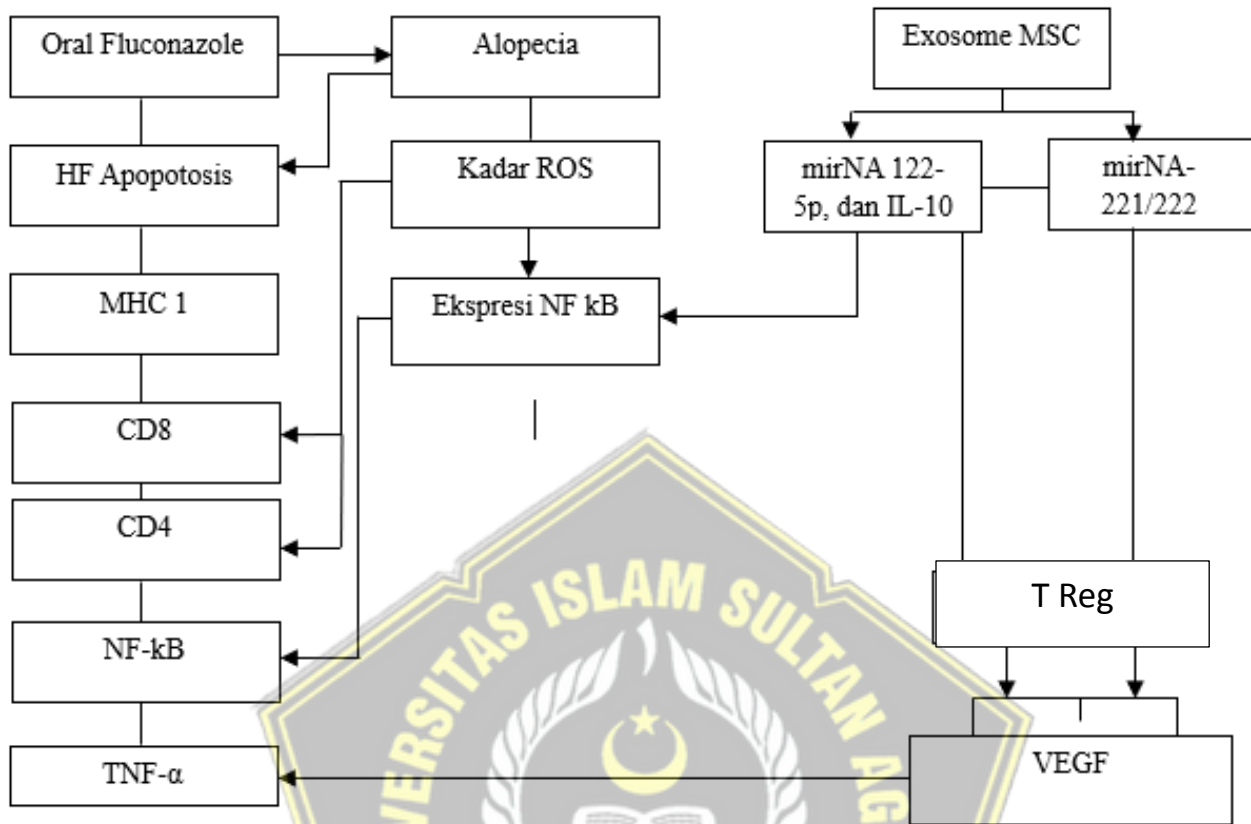
Pada folikel rambut AA, diyakini bahwa peningkatan aktivitas MHC kelas I dan MHC kelas II dikaitkan dengan perekrutan leukosit ke umbi rambut. Menggambarkan runtuhnya hak istimewa kekebalan folikel rambut, yang menyebabkan segerombolan sel CD8⁺ Sel T, CD4⁺ Sel T, sel penyaji antigen, dan sel *mast* yang mengelilingi folikel. Sel imunoinflamasi ini menyebabkan

gangguan siklus pertumbuhan rambut dan kerusakan folikel. Peningkatan ROS diketahui dapat meningkatkan produksi protein penghambat regenerasi rambut termasuk $\text{TNF-}\alpha$. $\text{TNF-}\alpha$ 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).¹⁰² Di sisi lain, penurunan VEGF yang disebabkan oleh efek fluconazole dapat mengurangi dukungan untuk proliferasi dan survival sel-sel folikel rambut. VEGF 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.¹⁰⁷ 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.¹⁰⁸ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ memainkan peran utama dalam mengatur jumlah ROS dalam sel, ROS memiliki berbagai peran penghambatan atau stimulasi dalam pensinyalan $\text{NF-}\kappa\text{B}$.¹⁰⁹ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ bertindak sebagai mediator utama yang menginduksi transkripsi gen sitokin dan kemokin yang diperlukan untuk respons imun. Jalur $\text{NF-}\kappa\text{B}$ nonkanonik mengontrol produksi interferon.¹¹⁰ Ekspresi $\text{NF-}\kappa\text{B}$ diharapkan pada jalur $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dapat menghambat apoptosis.



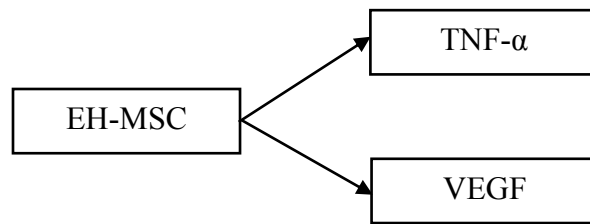
Gambar 3.1. Representasi skema untuk sumbu AR/miR-221/IGF1 yang mengatur jalur MAPK dan jalur PI3K/AKT.⁹²

Terakhir, miRNA-221/222 berperan dalam mengatur siklus pertumbuhan rambut dengan memodulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi sel-sel folikel rambut.¹¹¹ 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.¹¹² Sel regulator T (Treg), memainkan peran penting dalam menekan respons imun.¹¹³ Sel regulator T (Treg) mengeluarkan beberapa sitokin penghambat seperti IL-10 dan PDGF juga TNF- α . Sehingga diharapkan dapat mengurangi kadar TNF- α untuk menekan sitotoksitas sel T CD8 dan meningkatkan VEGF.



Gambar 3.2. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.3. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar TNF- α dan VEGF pada tikus model *alopecia-like* yang diinduksi fluconazol

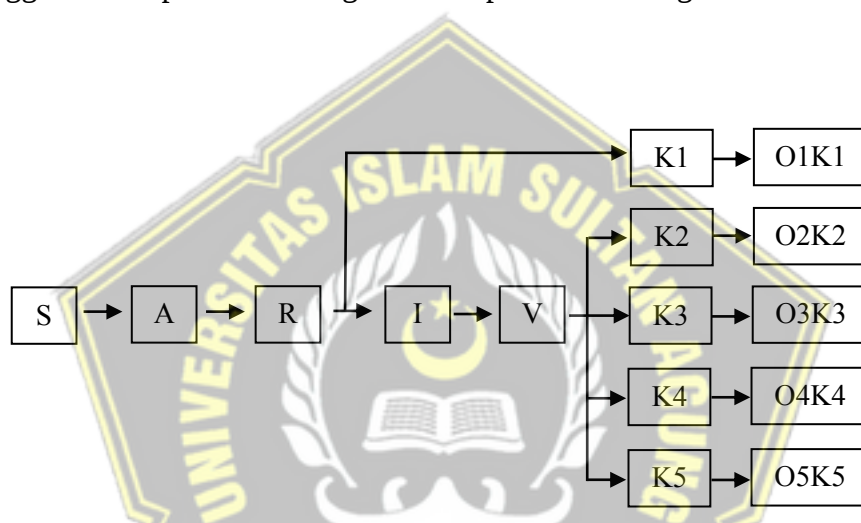


BAB IV

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 Penelitian

Keterangan:

S = Sampel

A = Aklimatisasi hewan coba

R = Randomisasi hewan coba

I = Induksi Fluconazol

V = Validasi

K1 = Tikus sehat, tidak diberi perlakuan

K2 = Tikus diinduksi Fluconazol dengan diberi NaCL 0.9 %

K3 = Tikus diinduksi Fluconazol dengan diberi Minoxidil 5%

K4 = Tikus diinduksi Fluconazol dengan diberi Exosome hipoxia MSC dosis 100 μ g/kgbb

K5 = Tikus diinduksi Fluconazol dengan diberi Exosome hipoxia MSC dosis 200µg/kgbb

O1K1 = Observasi kadar TNF-α DAN VEGF kelompok K1

O2K2 = Observasi kadar TNF-α DAN VEGF kelompok K2

O3K3 = Observasi kadar TNF-α DAN VEGF kelompok K3

O4K4 = Observasi kadar TNF-α DAN VEGF kelompok K4

O5K5 = Observasi kadar TNF-α DAN VEGF 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 hipoxia MSC
- b. Variabel Tergantung penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar TNF-α dan VEGF
- c. Variabel Prakondisi penelitian ini adalah pemberian fluconazol secara oral.

4.2.2. Definisi Operasional

- a. Injeksi exosome hipoxia MSC (EH-MSCs)

Adalah injeksi *Exosome Hipoxia MSC* secara subkutan menggunakan jarum 26G ke punggung hewan coba. Exosome diperoleh dari MSC yang dibiakkan dalam kondisi hipoxia, diisolasi dengan metode TFF dan disaring menggunakan filter 100 kDa dan 500 kDa, divalidasi dengan flow cytometry menggunakan penanda CD9 dan CD63. Injeksi exosome terbagi dalam beberapa kelompok yaitu kelompok K4 diberikan EH-MSC dosis 100µg/kgbb dan kelompok K5

diberikan EH-MSD dosis 200µg/kgbb

Skala: rasio

b. Kadar TNF- α

Adalah kadar TNF- α yang diukur dari sampel kulit punggung tikus pada hari ke-7 pasca injeksi bahan lalu diukur menggunakan metode ELISA sesuai protokol pabrikan (Elabscience No Cat: E-EL-H0109, Tx, USA). Pembacaan dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm. Satuan pg/mL.

Skala : Rasio

c. Kadar VEGF

Kadar VEGF adalah kadar VEGF yang diukur dari sampel kulit punggung tikus pada hari ke-7 pasca injeksi bahan perlakuan lalu diukur menggunakan metode ELISA sesuai protokol pabrikan (Elabscience. Cat.E-El-H0111, Tx, USA). Pembacaan dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm. Satuan pg/mL.

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 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 Jantan usia 6-8 minggu
- b. Berat badan 200-250 g
- c. Tidak memiliki kelainan anatomi
- d. Tidak pernah digunakan dalam penelitian lain sebelumnya

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang tidak mengalami kondisi *alopecia* like setelah induksi fluconazol selama 14 hari. *Alopecia* ditandai dengan ketiadaan fase telogen pada pewarnaan HE serta tidak mengalami pertumbuhan rambut punggung belakang pasca dicukur.
- b. 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 μ L 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 μ L larutan RIPA buffer
- f. Lakukan sentrifugasi hasil homogeniasasi 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 meliputi BSC, inkubator CO₂, sentrifuge, uPulse tangential flow filtration, serta membran filtrasi TFF berukuran 100 kDa dan 500 kDa untuk isolasi exosome dari medium kultur MSC. Alat yang digunakan untuk validasi MSC dan exosome hipoxia MSC mencakup flowcytometer, mikroskop inverted, dan inkubator. Peralatan lain yang digunakan termasuk mikropipet, tabung sentrifuge, pelat kultur sel, botol beher, shaker, pH meter, autoclave, serta 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 TNF- α (Elabscience No Cat: E-EL-H0109) dan VEGF (Elabscience No Cat: E-EL-H0111).

4.7. Cara Penelitian

4.7.1. *Ethical Clearance*

Setelah mendapatkan persetujuan dari pembimbing dan penguji, pengajuan *Ethical clearance* dilakukan 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.

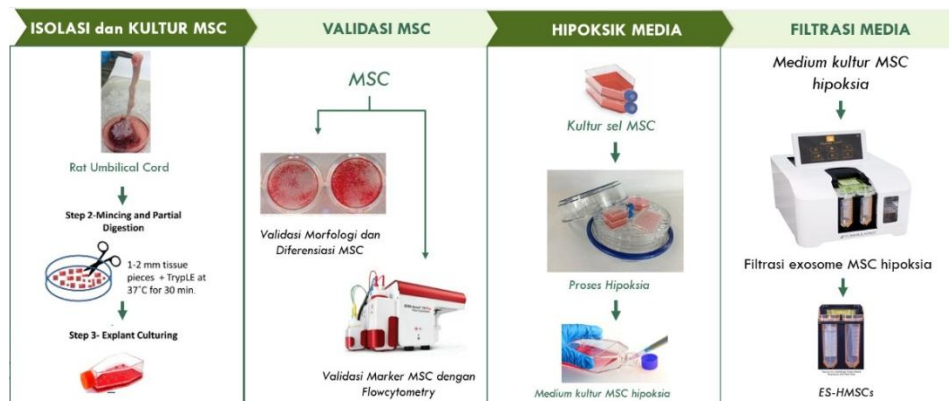
1. Setelah dikumpulkan, *umbilical cord* dimasukkan ke dalam wadah steril yang diberi NaCl 0,9%.
2. Dengan menggunakan pinset, masukkan *umbilical cord* ke dalam cawan petri dan gunakan PBS untuk membersihkannya secara menyeluruh.
3. *Umbilical cord* janin tikus dipotong dan pembuluh darahnya dibuang.
4. Setelah *umbilical cord* dicincang halus, diletakkan secara merata di dalam labu 25T dan diamkan selama tiga menit agar tisu menempel pada permukaan labu.
5. Media (DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan sedikit demi sedikit hingga jaringan tertutup.
6. Eksplan disimpan dalam inkubator dengan 5% CO₂ pada suhu 37°C.
7. Setelah prosedur kultur dimulai, sel akan berkembang setelah sekitar 14 hari.
8. Setiap tiga hari, media diganti dengan cara membuang setengahnya dan menambahkan yang baru dan penuh sebagai gantinya.
9. Pemeliharaan sel berlanjut hingga 80% sel konfluensi.

4.7.3. Proses Hipoxia

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

4.7.4. Pembuatan Exosome Hipoxia MSCs

Exosome Hipoxia MSCs diisolasi menggunakan metode TFF. Prosesnya meliputi pengumpulan media kultur hipoxia MSCs dalam botol steril, yang kemudian disaring menggunakan alat uPulse TFF dengan filter berukuran 100 kDa dan 500 kDa untuk memisahkan partikel besar. Hasil penyaringan kemudian divalidasi kandungan Exosome hipoxia MSCs menggunakan flowcytometri dengan penanda permukaan CD63, dan CD9. Setelah tervalidasi, Exosome hipoxia MSC disimpan dalam tabung 2,5 mL pada suhu 2-8°C.



Gambar 4.2. Isolasi MSC dan Pembuatan Exosome

4.7.5. Pembuatan Alopecia dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Setelah satu minggu adaptasi, tikus diberikan kombinasi xylazine (20 mg/kgbb) dan ketamine (60 mg/kgbb) untuk menginduksi anestesi.
2. Mencukur rambut pada punggung tikus
3. Tikus kelompok K1 tidak di berikan treatmen apapun. Tikus kelompok K2 sd K4 diberikan *fluconazol* 35 mg/kgBB per oral selama 14 hari menggunakan sonde
4. Hari ke-15, 1 dilakukan validasi
5. Dilakukan injeksi Subkutan pada punggung tikus. Injeksi NaCL dilakukan pada K2, Injeksi Minoxidil 5% pada K3, injeksi Exosome hipoxia MSC dosis 100µg/kgbb pada K4 , dan Injeksi Exosome hipoxia MSC dosis 200µg/kgbb pada K5
6. Hari ke-29 dilakukan pemeriksaan sampel
7. Jaringan yang telah dihomogenisasi disimpan dalam -80oC hingga proses analisis.

8. Periksa kadar TNF- α dan VEGF menggunakan ELISA sesuai protocol pabrik.

4.7.6. Metode Validasi

1. Validasi secara makroskopis dilakukan dengan mata peneliti dimana dinyatakan positif jika daerah yang dicukur tidak menunjukkan pertumbuhan rambut kembali dan
2. Validasi mikroskopis dengan pewarnaan Hematoksilin-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:
 - a. 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*.
 - b. Sampel kulit dibersihkan dari sisa larutan fiksatif dengan membilasnya menggunakan alkohol 70%.
 - c. Sampel ditandai dan ditempatkan dalam keranjang tisu setelah difiksasi dalam larutan BNF 10%.
 - d. Alkohol absolut dan alkohol bergradasi 70, 80%, 90%, dan 96% digunakan untuk mendehidrasi sampel jaringan.
 - e. Sampel dimasukkan ke dalam toluol selama satu jam, atau hingga menjadi bening atau transparan.

- f. 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.
- g. Kemudian sampel ditanam (*embedding*) dalam parafin dan blocking ditunggu hingga paraffin mengeras.
- h. Dengan menggunakan mikrotom, potong blok jaringan menjadi irisan berukuran 6µm. Kemudian letakkan potongan-potongan tersebut di atas permukaan kaca yang telah dilapisi perekat Mayer Albumin, ditetesi sedikit air suling, dan dipanaskan di atas hot plate hingga menempel sempurna.
- i. Sebelum pewarnaan jaringan, parafin dihilangkan (deparaffinisasi) dengan xylol selama sehari penuh.
- j. 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
- k. Setelah jaringan diwarnai selama 5–10 detik dengan hematoksilin, jaringan dibilas lagi selama 10 menit dengan air mengalir.

- l. Selama 3-5 menit, preparata direndam dalam alkohol masing-masing 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%.
- m. 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.
- n. Setelah 15 menit *clearing* xylol, balsam Kanada ditetaskan ke dalam sediaan histologi.
- o. Memasang slide jaringan dengan kaca penutup, memberi label, dan memasukkannya ke dalam kotak sediaan melengkapi prosedur ini.

4.7.7. Terminasi dan Pengambilan Jaringan

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

4.7.8. Preparasi Sampel

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

2. Letakkan jaringan yang telah diambil ke dalam tabung cryovial dan rendam dalam nitrogen cair untuk melakukan "snap freeze".
3. Simpan sampel pada suhu -80°C untuk digunakan nanti atau simpan di atas es untuk homogenisasi segera.
4. 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
5. Bilas mata homogenizer dua kali dengan menggunakan 300 μL larutan RIPA buffer
6. Lakukan sentrifugasi hasil homogenisasi selama 20 menit pada 13.000 rpm pada suhu 4°C .
7. 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

1. Tentukan sumuran untuk standar, blanko, dan sampel yang akan dianalisis
2. Tambahkan sebanyak 100 μL larutan standar, blanko, dan sampel ke sumur yang telah ditentukan
3. Tutup pelat sumuran menggunakan plastik penutup hingga rapat untuk mencegah terjadinya penguapan reagen, kemudian inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C .

4. Buang cairan dari setiap sumur, tanpa pembilasan. Segera tambahkan 100 μ L larutan Antibodi Deteksi Biotinilasi ke setiap sumur.
5. Tutupi pelat dengan penutup baru dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
6. Lakukan pencucian dengan menambahkan 350 μ L larutan *wash buffer* ke setiap sumur, diulangi sebanyak 3 kali.
7. Tambahkan 100 μ L Konjugat HRP ke setiap sumur.
8. Tutupi pelat dengan penutup baru, inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
9. Buang larutan dari setiap sumur, dan lakukan proses pembilasan sebanyak 5 kali seperti pada langkah 3.
10. Tambahkan 90 μ L Reagen Substrat ke setiap sumur.
11. Tutupi pelat dengan penutup baru, inkubasi selama sekitar 15 menit pada suhu 37°C.
12. Tambahkan 50 μ L larutan Stop ke setiap sumur.
13. Ukur Optical Density (OD) dari setiap sumur sekaligus menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

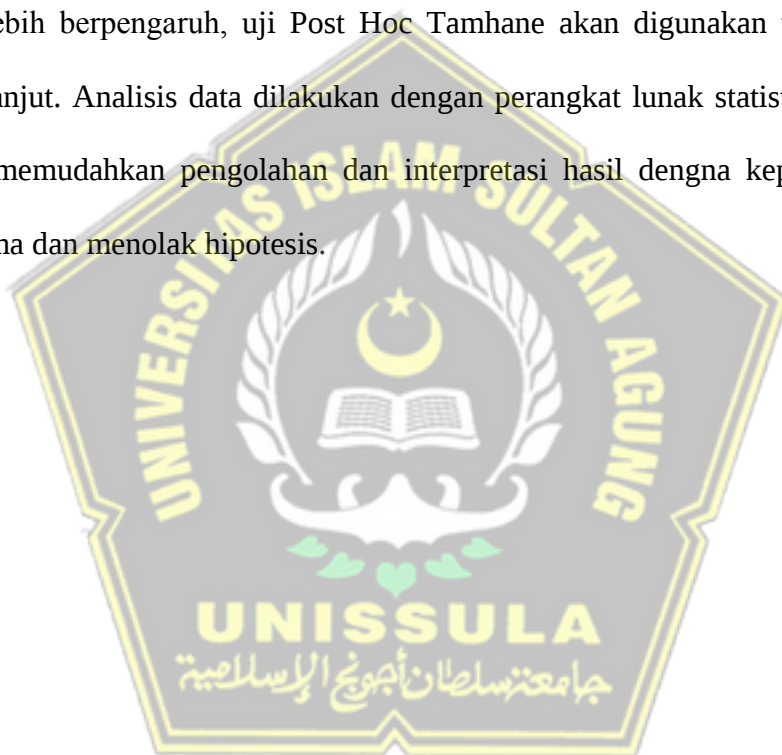
4.8. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang mencakup pembuatan Exosome hipoxia MSC, perlakuan terhadap hewan uji, hingga analisis variabel terikat dilakukan di Laboratorium SCCR Semarang, pada bulan November hingga Desember 2024.

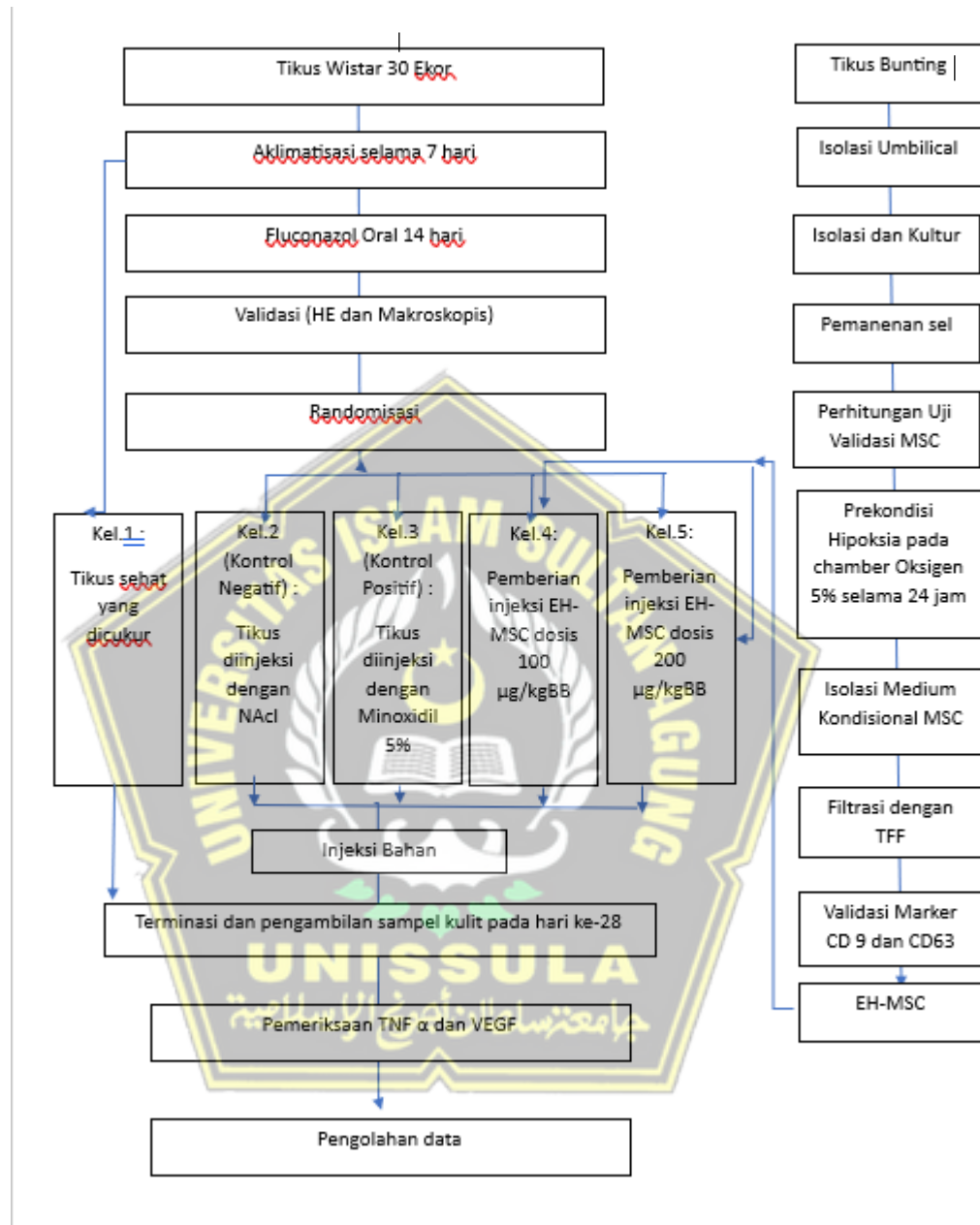
4.9. Analisa Data

Selanjutnya, analisis normalitas dan variasi data dilakukan. Analisis distribusi data menggunakan uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($p > 0,05$) pada kedua parameter. Selanjutnya, uji homogenitas varians menggunakan Levene's Test menunjukkan data tidak homogen ($p < 0,05$).

Untuk mengevaluasi perbedaan antar kelompok dan mengetahui dosis mana yang lebih berpengaruh, uji Post Hoc Tamhane akan digunakan untuk analisis lebih lanjut. Analisis data dilakukan dengan perangkat lunak statistik SPSS 27.0 untuk memudahkan pengolahan dan interpretasi hasil dengan keputusan untuk menerima dan menolak hipotesis.



4.10. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

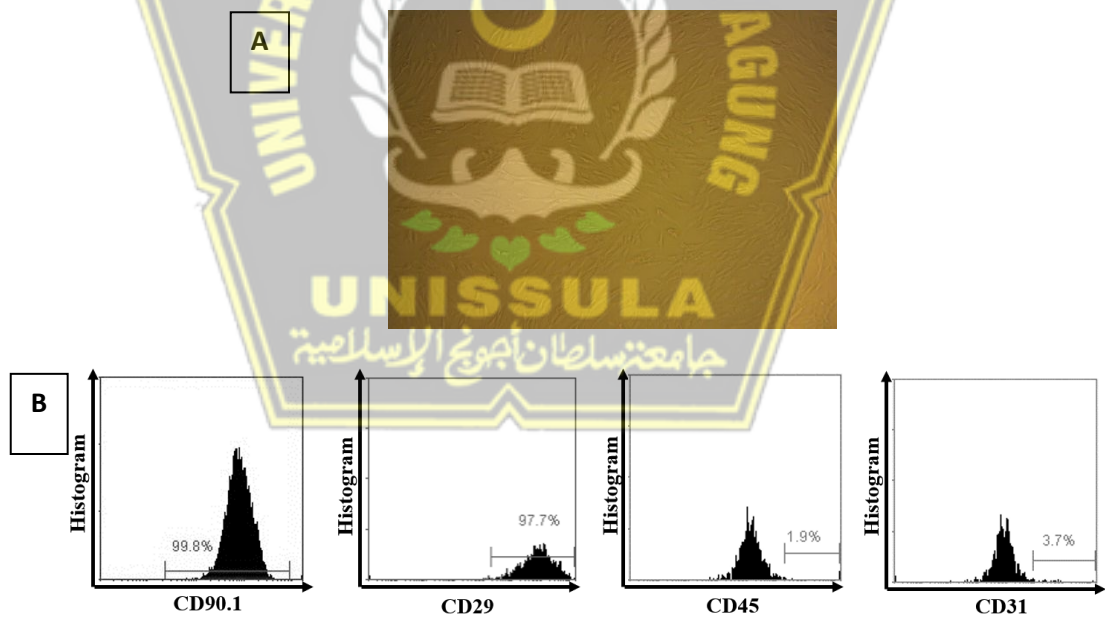
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Validasi EH-MSC

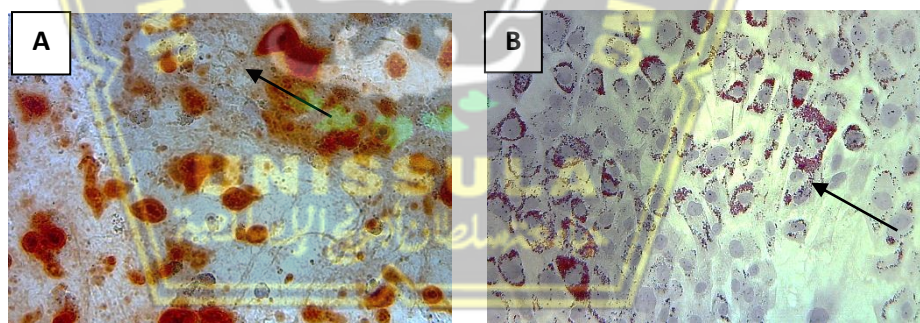
Mesenchymal stem cell yang digunakan pada penelitian ini berasal dari tali pusat tikus pada usia kehamilan 21 hari yang diisolasi di Lab SCCR Semarang. Setelah proses isolasi, sel-sel tersebut dikultur dalam Flask kultur berisi media DMEM. Setelah pasase kelima, dilakukan analisis morfologi sel menggunakan mikroskop dan ditemukan sel *spindle* yang melekat di atas permukaan flask (Gambar 9).



Gambar 5.1. Morfologi MSC. (A) Isolasi MSCs yang berbentuk *spindle-like* (ditunjuk anak panah) dengan pembesaran 100x.. (B) Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31.

Analisis identitas sel memanfaatkan *surface marker* MSC dengan 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.

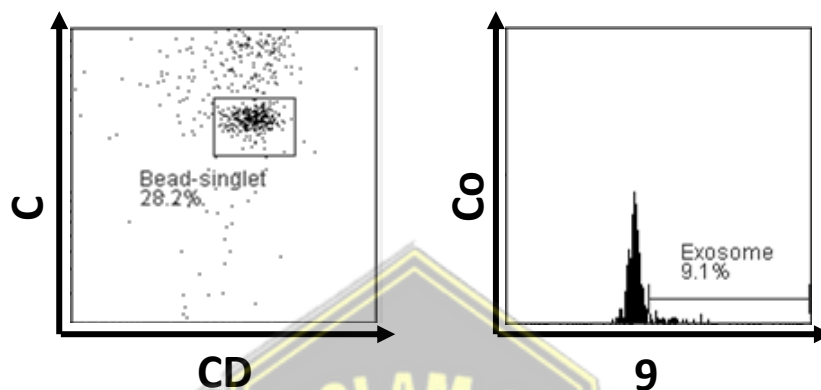
Untuk memastikan kapasitas diferensiasi MSC menjadi berbagai jenis sel dewasa seperti sel osteosit dan sel adiposit dilakukan dengan pembiakan menggunakan medium spesifik untuk menginduksi diferensiasi. Sesudahnya dilakukan pewarnaan *Alizarin Red* dan *oil Red O* dimana ditemukan adanya endapan kalsium dan lemak pada pemeriksaan mikroskopis. (Gambar 5.2 A dan B).



Gambar 5.2. Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin red pada pembesaran 400x (A) dan Adiposit pada pewarnaan oil red o pada pembesaran 400x (B)

Setelah tervalidasi, MSC kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia pada konsesntrasi 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 dimana kadar exosome yang diperoleh adalah sebesar 7.5 ug/mL (Gambar 5.3).



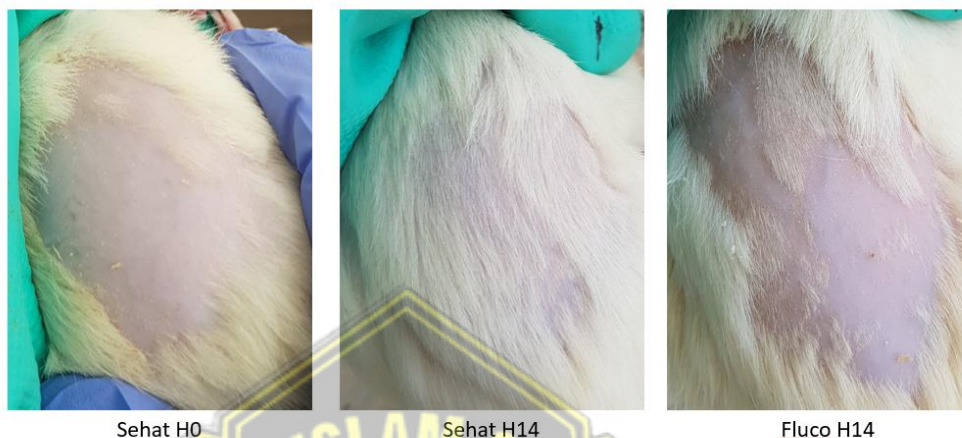
Gambar 5.3. Hasil Analisis Kadar Exosome menggunakan marker CD63 dan CD9

5.1.2. Hasil Validasi Alopecia-like

Validasi pembentukan model Alopecia-like pada tikus dilakukan secara makroskopis yakni dengan membandingkan kondisi densitas rambut pada tikus sehat dan tikus yang diinduksi fluconazole secara visual, dimana rambut tikus dicukur lebih dahulu sebelum induksi dan diamati bagaimana pertumbuhannya pasca induksi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tikus sehat memiliki kemampuan menumbuhkan rambut kembali dengan densitas rambut yang lebih padat, sementara tikus yang diinduksi fluconazole memiliki densitas rambut yang lebih rendah pasca pencukuran, sebagaimana terlihat dalam Gambar 5.4.

Selain itu, dilakukan juga pengamatan mikroskopis pada kulit punggung yang telah diberi pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE). Hasil analisis menunjukkan bahwa folikel pada model tikus alopecia-like didominasi fase

telogen pada kelompok K2, K3, K4 dan K5 dibandingkan dengan kelompok sehat (K1). Hasil validasi dengan pewarnaan HE ditunjukkan pada gambar 5.5.



Gambar 5.4. Validasi Makroskopis Alopecia-like. Hari ke-14 setelah dicukur, tikus sehat menunjukkan pertumbuhan rambut yang baik, sedangkan tikus yang dipapar fluconazole gagal menunjukkan pertumbuhan rambut yang adekuat



Gambar 5.5. Validasi mikroskopis Tikus sehat dan Alopecia-like menggunakan HE. Panah hitam menunjukkan fase telogen dan panah merah menunjukkan fase anagen

Setelah tikus tervalidasi mengalami *Alopecia-like*, tikus yang tidak diinduksi 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 subkutan

Aquabides dosis 100 uL), K3 (tikus *Alopecia-like* dengan injeksi subkutan minoxidil 5% dosis 100 uL), K4 dan K5 (masing-masing merupakan tikus *Alopecia-like* dengan injeksi EH-MSC secara subkutan dengan dosis 100 uL/kgBB dan 200 uL/kgBB).

Injeksi EH-MSC diberikan satu kali, yakni pada hari pertama setelah tikus dinyatakan mengalami kondisi *alopecia-like*. Terminasi tikus dan pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-7 setelah injeksi. Jaringan kulit kemudian dihomogenisasi menggunakan RIPA buffer yang telah ditambahkan inhibitor proteinase untuk menghambat kerusakan protein. Setelah jaringan terhomogenisasi menjadi suspensi, dilakukan proses sentrifugasi, lalu supernatan dikumpulkan lalu dilakukan analisis kadar TNF- α dan VEGF dengan menggunakan metode ELISA.

5.1.3. Kadar TNF- α

Data kadar TNF- α dari lima kelompok (K1 hingga K5) menunjukkan variasi yang signifikan dalam konsentrasi. Kelompok K2 memiliki kadar TNF- α tertinggi, yaitu 307.46 ± 20.68 pg/mL, diikuti oleh K3 dengan 190.50 ± 20.11 pg/mL, dan K4 dengan 65.38 ± 15.05 pg/mL. Kelompok K5 memiliki kadar yang lebih rendah sebesar 37.16 ± 7.14 pg/mL, sementara kadar terendah ditemukan pada K1 35.43 ± 7.51 dengan pg/mL.

Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Kadar TNF- α

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	
TNF-α	35.43	307.46	190.50	65.38	37.16	
Std. deviasi	7.51	20.68	20.11	15.05	7.14	
Shapiro Wilk						>0,05
Lavene test						<0,05
One Way Anova						0,00

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 TNF- α pada kelima kelompok memiliki varians yang tidak homogen ($p < 0,05$).

Berdasarkan data kadar TNF- α yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji Post Hoc Tamhane, karena data bersifat normal dan homogen. Data hasil uji post hoc Tamhane tersebut ditampilkan dalam Tabel 3. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa antara K1, K2, K3 dan K4 memiliki perbedaan signifikan ($p < 0,05$), namun antara K1 dan K5 tidak ditemukan perbedaan secara signifikan ($p > 0,05$). Data juga menunjukkan data kadar TNF- α K4 dan K5 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya yang dijadikan kontrol. Diketahui juga bahwa kadar TNF- α K5 hanya lebih tinggi sedikit jika dibandingkan dengan kelompok sehat.

kadar VEGF terendah ditemukan pada kelompok K2 dengan $69,60 \pm 15,39$ pg/mL.

Tabel 5.3. Data Hasil Analisis Kadar VEGF

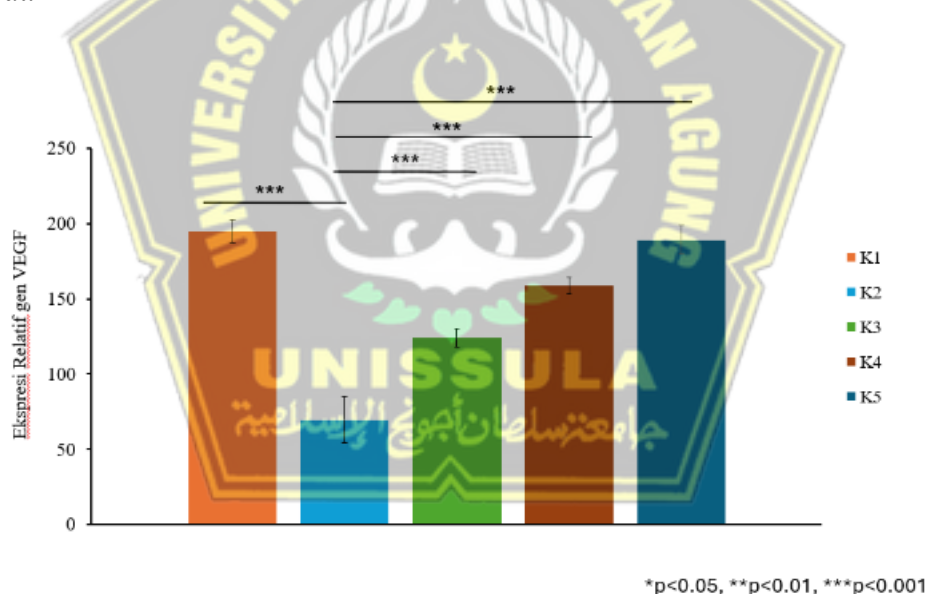
Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	
Std. deviasi	7.65	15.3	6.18	5.33	9.75	
Shapiro Wilk						>0,05
Lavene test						<0,05
One Way						0,00
Anova						

Uji statistik Shapiro-Wilk yang dilakukan untuk mengevaluasi distribusi data menunjukkan bahwa data kadar VEGF 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 VEGF 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 VEGF antar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol.

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

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0.000
	K3	0.000
	K4	0.000
	K5	0.963
K2	K3	0.001
	K4	0.000
	K5	0.000
K3	K4	0.000
	K5	0.000
K4	K5	0.002

Berdasarkan data kadar VEGF yang memiliki beda nyata setelah 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. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K1 berbeda signifikan dibanding dengan K2, K3, dan K4 ($p < 0,05$) dan tidak berbeda signifikan dibanding dengan K5 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa kadar VEGF K1 dan K5 tidak berbeda secara bermakna, dimana berarti kadar VEGF model tikus *alopecia-like* yang diberikan EH-MSc 200 uL/kgBB sama dengan kelompok sehat.



Gambar 5.7. Grafik Kadar VEGF pada jaringan kulit setelah pemberian EH-MSCs.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Peradangan kronis memainkan peran sentral pada kasus *alopecia-like*. Faktor transkripsi NF- κ B memiliki peran dalam mengatur berbagai fungsi dalam

sistem kekebalan alamiah dan adaptif, serta berperan sebagai mediator penting dalam merespons kondisi peradangan. NF- κ B memicu ekspresi sejumlah gen pro-inflamasi, termasuk gen-gen yang mengkode sitokin dan kemokin, dan juga turut berpartisipasi dalam mengatur proses peradangan. Oleh karena itu, aktivasi yang tidak terkontrol dari NF- κ B dapat berkontribusi pada perkembangan berbagai penyakit yang berkaitan dengan peradangan. Inflamasi dimulai ketika sel-sel peradangan merespons stimulasi oleh molekul sinyal bahaya yang dilepaskan sebagai respons terhadap kerusakan jaringan atau eksposur terhadap zat tertentu, baik itu dari mikroorganisme patogenik maupun faktor faktor lainnya.¹⁻¹⁴

EH-MSC 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-MSC 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-MSC, seperti miR-122 dan miR-221, terbukti memiliki peran penting dalam mengatur jalur biologis yang berkaitan dengan pengaturan kadar TNF- α dan VEGF.^{84,85}

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. Selain itu, miR-221 juga memainkan peran penting dalam pengaturan VEGF.⁹² MiR-221 dapat meningkatkan ekspresi VEGF melalui

pengaturan jalur proliferasi sel dan angiogenesis. Protein VEGF 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 VEGF, yang pada gilirannya dapat memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh *alopecia* dan mempercepat pertumbuhan rambut.⁶³⁻⁶⁵

Pada penelitian ini, pemberian EH-MSC dengan dosis 100 μ L dan 200 μ L pada tikus model *alopecia-like* bertujuan untuk mengevaluasi efeknya terhadap kadar TNF- α dan VEGF serta hubungan kedua parameter ini dengan regulasi imun dan perkembangan *alopecia*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis 200 μ L EH-MSC dapat menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan kadar VEGF secara signifikan hingga mencapai kadar yang setara dengan tikus sehat.

Penurunan kadar TNF- α yang signifikan pada kelompok tikus yang diberikan 200 μ L EH-MSC menunjukkan bahwa dosis tersebut berhasil mengaktifkan jalur-jalur biologis yang berperan dalam proses inflamasi di sekitar folikel rambut, yang selanjutnya berhubungan dengan pengurangan gejala *alopecia*. TNF- α , bersama dengan interleukin 1 α (IL-1 α) dan IL-1 β , menyebabkan vakuolisasi sel-sel matriks di dalam bulbus folikel rambut dan penurunan ukuran matriks dan juga menyebabkan disorganisasi melanosit folikel dan diferensiasi abnormal serta keratinisasi sel-sel prekortikal dan selubung akar bagian dalam pada pasien dengan *alopecia areata*.^{49,50}

Sementara itu, kadar VEGF yang meningkat mengurangi kerontokan rambut dengan membentuk pembuluh darah baru dan meningkatkan sirkulasi darah di sekitar folikel rambut.³⁸

Penelitian menunjukkan bahwa ekspresi berlebih dari VEGF pada keratinosit folikel mengakibatkan percepatan pertumbuhan kembali rambut dan peningkatan ukuran folikel rambut, memberikan bukti langsung pertama bahwa peningkatan angiogenesis dapat meningkatkan pertumbuhan rambut dan juga menyebabkan peningkatan ketebalan rambut.³⁹

Pemberian EH-MSC pada dosis 200 μ L 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 200 μ L EH-MSC lebih efektif dalam menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan kadar VEGF dibandingkan dengan dosis 100 μ L 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 VEGF, yang berperan dalam perbaikan folikel rambut dan pembentukan pembuluh darah.⁸⁹⁻⁹⁴

Namun, penelitian ini memiliki keterbatasan yakni desain penelitian adalah post test only control grup dimana tidak dilakukan pengukuran variabel sebelum perlakuan sehingga tidak ada data baseline. Sulit dipastikan apakah ada perbedaan dari awal yang mempengaruhi hasil. Selain itu, penelitian ini hanya mengukur efek pada satu titik waktu dan tidak menilai hasil secara jangka panjang.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasar hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian EH-MSC dosis 100 ug/kgBB dan 200 ug/kgBB secara subkutan memberikan pengaruh berupa penurunan kadar TNF- α pada tikus model *Alopecia-like* dibandingkan dengan tikus kontrol positif maupun negatif dengan bermakna.
2. Pemberian EH-MSC dosis 100 ug/kgBB dan 200 ug/kgBB secara subkutan memberikan pengaruh berupa peningkatan kadar VEGF pada tikus model *Alopecia-like* dibandingkan dengan tikus kontrol positif maupun negatif dengan bermakna.
3. Pemberian EH-MSC secara subkutan menunjukkan hasil *dose-dependent manner* dimana treatment dengan dosis 200 μ L/kgBB dinilai lebih optimal karena menunjukkan hasil kadar TNF- α dan VEGF mendekati kondisi normal.

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian dengan model *pre dan post control group design* model *alopecia-like* untuk memperoleh hasil yang lebih valid.

DAFTAR PUSTAKA

1. Oxford Language. *Alopecia* (Internet). 2010 (disitasi Agustus 2024). Diakses dari <https://languages.oup.com/>
2. Maloh J, Engel T, Natarelli N, Nong Y, Zufall A, Sivamani RK. *Systematic Review of Psychological Interventions for Quality of Life, Mental Health, and Hair Growth in Alopecia Areata and Scarring Alopecia*. J Clin Med. 2023 Jan 26;12(3):964. doi: 10.3390/jcm12030964. PMID: 36769612; PMCID: PMC9917611.
3. Rambawasvika H. Alopecia types, current and future treatmen. Journal of Dermatology & Cosmetology. 2021;5(4):93-99. doi:10.15406/jdc.2021.05.00190
4. Ahmad M.; Hasnain A. Syed; Patrick M. *Alopecia* [Internet]. National Library of Medicine; Agustus 2024. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538178/>
5. 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). doi:10.4081/dr.2022.9341
6. Rajendran RL, Gangadaran P, Bak SS, Oh JM, Kalimuthu S, Lee HW, Baek SH, Zhu L, Sung YK, Jeong SY, Lee SW, Lee J, Ahn BC. *Extracellular vesicles derived from MSCs activates dermal papilla cell in vitro and promotes hair follicle conversion from telogen to anagen in mice*. Sci Rep. 2017 Nov 14;7(1):15560. doi: 10.1038/s41598-017-15505-3. PMID: 29138430; PMCID: PMC5686117.
7. Kutyl-Pachecka M. Psychological and psychopathological factors in alopecia areata. Psychiatr Pol. 2015;49(5):955-64. English, Polish. doi: 10.12740/PP/39064. PMID: 26688846.
8. Ghanizadeh A, Ayoobzadehshirazi A. A review of psychiatric disorders comorbidities in patients with alopecia areata. Int J Trichology. 2014

- Jan;6(1):2-4. doi: 10.4103/0974-7753.136746. PMID: 25114444; PMCID: PMC4124688.
9. Koo JY, Shellow WV, Hallman CP, Edwards JE. *Alopecia areata* and increased prevalence of psychiatric disorders. *Int J Dermatol*. 1994 Dec;33(12):849-50. doi: 10.1111/j.1365-4362.1994.tb01018.x. PMID: 7883407.
 10. Liakopoulou M, Alifieraki T, Katideniou A, Kakourou T, Tselalidou E, Tsiantis J, Stratigos J. Children with *alopecia areata*: psychiatric symptomatology and life events. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997 May;36(5):678-84. doi: 10.1097/00004583-199705000-00019. PMID: 9136503.
 11. Aşkın Ö, Koyuncu Z, Serdaroglu 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.
 12. Gupta S, Goyal I, Mahendra A. Quality of Life Assessment in Patients with Androgenetic *Alopecia*. *Int J Trichology*. 2019 Jul-Aug;11(4):147-152. doi: 10.4103/ijt.ijt_6_19. PMID: 31523105; PMCID: PMC6706984.
 13. Chiang YZ, Bundy C, Griffiths CE, Paus R, Harries MJ. The role of beliefs: lessons from a pilot study on illness perception, psychological distress and quality of life in patients with primary cicatricial *alopecia*. *Br J Dermatol*. 2015 Jan;172(1):130-7. doi: 10.1111/bjd.13259. Epub 2014 Dec 7. PMID: 25039441.
 14. Mounsey AL, Reed SW. Diagnosing and treating hair loss. *Am Fam Physician*. 2009 Aug 15;80(4):356-62. PMID: 19678603.
 15. Salisbury BH, Leslie SW, Tadi P. 5 α -Reductase Inhibitors [Internet]. In: StatPearls Publishing; 2024. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555930/>
 16. Harries MJ, Sun J, Paus R, King LE Jr. Management of *alopecia areata*. *BMJ*. 2010 Jul 23;341:c3671. doi: 10.1136/bmj.c3671. PMID: 20656774; PMCID: PMC3230136.17. Simakou T., Butcher JP, Reid S., Henriquez

- FL *Alopecia* Areata: Kondisi Autoimun Multifaktorial. *J. Autoimmun.* 2019; 98 :74–85. doi: 10.1016/j.jaut.2018.12.001.
17. Simakou T, Butcher JP, Reid S, Henriquez FL. *Alopecia areata: A multifactorial autoimmune condition.* *J Autoimmun.* 2019 Mar;98:74-85. doi: 10.1016/j.jaut.2018.12.001. Epub 2018 Dec 15. PMID: 30558963.
 18. Starace M, Orlando G, Alessandrini A, Piraccini BM. Female Androgenetic *Alopecia: An Update on Diagnosis and Management.* *Am J Clin Dermatol.* 2020 Feb;21(1):69-84. doi: 10.1007/s40257-019-00479-x. PMID: 31677111.
 19. Pekmezci E, Türkoğlu M. Minoxidil Acts as an Antiandrogen: A Study of 5 α -reductase Type 2 Gene Expression in a Human Keratinocyte Cell Line. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2017 Dec;25(4):271-275. PMID: 30064598.
 20. Asfour L, Cranwell W, Sinclair R. Male Androgenetic Alopecia. 2023 Jan 25. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–. PMID: 25905192.
 21. Zari Shadi. Compliance to Topical Minoxidil and Reasons for Discontinuation among Patients with Androgenetic *Alopecia.* *Dermatol Ther (Heidelb)* (2023) 13:1157–1169 <https://doi.org/10.1007/s13555-023-00919-x>
Dermatol Ther (Heidelb) (2023) 13:1157–1169
 22. V. Gargallo, C. Gutierrez, F. Vanaclocha, A. Guerra-Tapia. Generalized Hypertrichosis Due to Topical Minoxidil. *ACTAS dermato-sifilograficas.* Vol. 106. Issue 7. Pages 599-600 (September 2015). DOI: 10.1016/j.adengl.2015.06.019.
 23. Patrick M. Zito ; Karlyle G. Bistas ; Preeti Patel ; Kirin Syed. Finasterida. National Library of Medicine (internet), 2024. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513329/#:~:text=Finasteride%20is>

[%20an%20FDA%2Dapproved,to%20treat%20benign%20prostatic%20hyperplasia.](#)

24. Panchaprateep R, Lueangarun S. Efficacy and Safety of Oral Minoxidil 5 mg Once Daily in the Treatmen of Male Patients with Androgenetic *Alopecia*: An Open-Label and Global Photographic Assessment. *Dermatol Ther* (Heidelb). 2020 Dec;10(6):1345-1357. doi: 10.1007/s13555-020-00448-x. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32970299; PMCID: PMC7649170.
25. Vañó-Galván S, Pirmez R, Hermosa-Gelbard A, Moreno-Arrones ÓM, Saceda-Corralo D, Rodrigues-Barata R, Jimenez-Cauhe J, Koh WL, Poa JE, Jerjen R, Trindade de Carvalho L, John JM, Salas-Callo CI, Vincenzi C, Yin L, Lo-Sicco K, Waskiel-Burnat A, Starace M, Zamorano JL, Jaén-Olasolo P, Piraccini BM, Rudnicka L, Shapiro J, Tosti A, Sinclair R, Bhoirul B. Safety of low-dose oral minoxidil for hair loss: A multicenter study of 1404 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2021 Jun;84(6):1644-1651. doi: 10.1016/j.jaad.2021.02.054. Epub 2021 Feb 24. PMID: 33639244.
26. Tan, F., Li, X., Wang, Z. *et al.* Clinical applications of stem cell-derived exosomes [Internet]. *Sig Transduct Target Ther* **9**, 17 (2024). Diakses dari <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01704-0>
27. Ajit A, Nair MD, Venugopal B. Exploring the Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for the Treatmen of *Alopecia*. *Regen Eng Transl Med*. 2021;7(2):119-128. doi:10.1007/s40883-021-00204-3
28. Li Y, Wang G, Wang Q, Zhang Y, Cui L, Huang X. Exosomes Secreted from Adipose-Derived Stem Cells Are a Potential Treatmen Agent for Immune-Mediated *Alopecia*. *J Immunol Res*. 2022;2022. doi:10.1155/2022/7471246
29. Dong J, Wu B, Tian W. Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells (hypoMSCs-Exo): advantages in disease treatmen. *Cell Tissue Res*. 2023;392(3):621-629. doi:10.1007/s00441-023-03758-6
30. 30. Mark L. Weiss* and Deryl L. Troyer. Stem Cells in the Umbilical Cord. *Stem Cell Rev*. 2006; 2(2): 155–162; available in PMC 2013 Aug 26. doi: [10.1007/s12015-006-0022-y](https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y)

31. Whicher JT, Evans SW. Cytokines in disease. Clin Chem. 1990 Jul;36(7):1269-81. PMID: 2197032.
32. Philpott MP, Sanders DA, Bowen J, Kealey T. Effects of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor on human hair follicle growth in vitro: a possible role for interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in *alopecia* areata. Br J Dermatol. 1996 Dec;135(6):942-8. doi: 10.1046/j.1365-2133.1996.d01-1099.x. PMID: 8977716.
33. Hoffmann R, Eicheler W, Huth A, Wenzel E, Happle R. Cytokines and growth factors influence hair growth in vitro. Possible implications for the pathogenesis and treatment of *alopecia* areata. Arch Dermatol Res. 1996 Mar;288(3):153-6. doi: 10.1007/BF02505825. PMID: 8967784.
34. Thein C, Strange P, Hansen ER, Baadsgaard O. Lesional *alopecia* areata T lymphocytes downregulate epithelial cell proliferation. Arch Dermatol Res. 1997 Jun;289(7):384-8. doi: 10.1007/s004030050209. PMID: 9248616.
35. Kasumagic-Halilovic E, Prohic A, Cavaljuga S. Tumor necrosis factor-alpha in patients with *alopecia* areata. Indian J Dermatol. 2011 Sep-Oct;56(5):494-6. doi: 10.4103/0019-5154.87124. PMID: 22121261; PMCID: PMC3221206.
36. Miele C, Rochford JJ, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Van Obberghen E. Insulin and insulin-like growth factor-I induce *vascular endothelial growth factor* mRNA expression via different signaling pathways. J Biol Chem. 2000 Jul 14;275(28):21695-702. doi: 10.1074/jbc.M000805200. PMID: 10777488.
37. Yeh LC, Lee JC. Osteogenic protein-1 increases gene expression of *vascular endothelial growth factor* in primary cultures of fetal rat calvaria cells. Mol Cell Endocrinol. 1999 Jul 20;153(1-2):113-24. doi: 10.1016/s0303-7207(99)00076-3. PMID: 10459859.
38. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. Endocrinology. 2000 May;141(5):1667-74. doi: 10.1210/endo.141.5.7458. PMID: 10803575.

39. Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(4):409-17. doi: 10.1172/JCI11317. PMID: 11181640; PMCID: PMC199257.
40. Thompson Iii GR, Krois CR, Affolter VK, *et al*. Examination of Fluconazol-Induced *Alopecia* in an Animal Model and Human Cohort. Published online 2019. doi:10.1128/AAC
41. Wang G, Wang Z, Zhang J, Shen Y, Hou X, Su L, Chen W, Chen J, Guo X, Song H. Treatment of androgenetic alopecia by exosomes secreted from hair papilla cells and the intervention effect of LTF. *J Cosmet Dermatol*. 2023 Nov;22(11):2996-3007. doi: 10.1111/jocd.15890. Epub 2023 Aug 8. PMID: 37553912.
42. Huh Ch, Park BS. EXOSOME FOR HAIR REGENERATION: FROM BENCH TO BEDSIDE. Abstract Book 24th World Congress of Dermatology Milan Juni 2019 (Internet). Diakses dari <https://www.wcd2019milan-dl.org/abstract-book/documents/abstracts/18-hair-disorders/exosome-for-hair-regeneration-from-5699.pdf>
43. Kim M, Shin D Il, Choi BH, Min BH. Exosomes from IL-1 β -Primed Mesenchymal Stem Cells Inhibited IL-1 β - and TNF- α -Mediated Inflammatory Responses in Osteoarthritic SW982 Cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2021;18(4):525-536. doi:10.1007/s13770-020-00324-x
44. Wu J, Yang Q, Wu S, Yuan R, Zhao X, Li Y, Wu W, Zhu N. Adipose-Derived Stem Cell Exosomes Promoted Hair Regeneration. *Tissue Eng Regen Med*. 2021 Aug;18(4):685-691. doi: 10.1007/s13770-021-00347-y. Epub 2021 Jun 25. PMID: 34173219; PMCID: PMC8325725.
45. Bak DH, Choi MJ, Kim SR, *et al*. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells engineered to overexpress growth factors accelerate outcomes in hair growth. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2018;22(5):555-566. doi:10.4196/kjpp.2018.22.5.555
46. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Jul;49(7):1215-28. doi:

- 10.1093/rheumatology/keq031. Epub 2010 Mar 1. PMID: 20194223; PMCID: PMC2886310.
47. Jiang Y, Yu M, Hu X, Han L, Yang K, Ba H, Zhang Z, Yin B, Yang XP, Li Z, Wang J. STAT1 mediates transmembrane TNF- α -induced formation of death-inducing signaling complex and apoptotic signaling via TNFR1. *Cell Death Differ.* 2017 Apr;24(4):660-671. doi: 10.1038/cdd.2016.162. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28186502; PMCID: PMC5384023
 48. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 8;22(5):2719. doi: 10.3390/ijms22052719. PMID: 33800290; PMCID: PMC7962638.
 49. Hegde SP, Naveen KN, Athanikar SB, Reshme P. Clinical and dermatoscopic patterns of *alopecia* areata: a tertiary care centre experience. *Int J Trichology.* 2013 Jul;5(3):132-6. doi: 10.4103/0974-7753.125608. PMID: 24574691; PMCID: PMC3927170.
 50. Paus R, Olsen EA. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th edn. New York: McGraw-Hill; 2007. Hair growth disorders. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, editors; pp. 753–777
 51. Shrivastava SB. Diffuse hair loss in an adult female: approach to diagnosis and management. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009 Jan-Feb;75(1):20-7; quiz 27-8. doi: 10.4103/0378-6323.45215. PMID: 19172026.
 52. Dhurat R, Saraogi P. Hair evaluation methods: merits and demerits. *Int J Trichology.* 2009 Jul;1(2):108-19. doi: 10.4103/0974-7753.58553. PMID: 20927232; PMCID: PMC2938572.
 53. Routsi C, Meletiadiis J, Charitidou E, Gkoufa A, Kokkoris S, Karageorgiou S, Giannopoulos C, Koulenti D, Andrikogiannopoulos P, Perivolioti E, Argyropoulou A, Vasileiadis I, Vrioni G, Paramythiotou E. Epidemiology of Candidemia and Fluconazol Resistance in an ICU before and during the

- COVID-19 Pandemic Era. *Antibiotics* (Basel). 2022 Jun 4;11(6):771. doi: 10.3390/antibiotics11060771. PMID: 35740177; PMCID:PMC9219849
54. S. Harrison. Telogen effluvium. *Clinical and Experimental Dermatology*, Volume 27, Issue 5, 1 July 2002: 389–395
 55. Ye X, Gaucher JF, Vidal M, Broussy S. A Structural Overview of Vascular Endothelial Growth Factors Pharmacological Ligands: From Macromolecules to Designed Peptidomimetics. *Molecules*. 2021 Nov 9;26(22):6759. doi: 10.3390/molecules26226759. PMID: 34833851; PMCID: PMC8625919.
 56. Back SH, Yoon JB, Sim WY, Haw CR. Efek faktor pertumbuhan endotel vaskuler pada pertumbuhan rambut in vitro. *Korean J Dermatol*. 1999;37:23–30.
 57. Zhou C, Li X, Wang C, Zhang J. *Alopecia Areata*: an Update on Etiopathogenesis, Diagnosis, and Management. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021 Dec;61(3):403-423. doi: 10.1007/s12016-021-08883-0. Epub 2021 Aug 17. PMID: 34403083.
 58. Lee HH, Gwillim E, Patel KR, Hua T, Rastogi S, Ibler E, Silverberg JI. Epidemiology of *alopecia areata*, *ophiasis*, *totalis*, and *universalis*: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2020 Mar;82(3):675-682. doi: 10.1016/j.jaad.2019.08.032. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31437543.
 59. Wu MC, Yang CC, Tsai RY, Chen WC. Late-onset *alopecia areata*: a retrospective study of 73 patients from Taiwan. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Apr;27(4):468-72. doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04467.x. Epub 2012 Feb 20. PMID: 22339888.
 60. Jadeja SD, Tobin DJ. Autoantigen Discovery in the Hair Loss Disorder, *Alopecia Areata*: Implication of Post-Translational Modifications. *Front Immunol*. 2022 Jun 3;13:890027. doi: 10.3389/fimmu.2022.890027. PMID: 35720384; PMCID: PMC9205194.
 61. Waśkiel-Burnat A, Osińska M, Salińska A, Blicharz L, Goldust M, Olszewska M, Rudnicka L. The Role of Serum Th1, Th2, and Th17

- Cytokines in Patients with *Alopecia Areata*: Clinical Implications. *Cells*. 2021 Dec 2;10(12):3397. doi: 10.3390/cells10123397. PMID: 34943905; PMCID: PMC8699846.
62. Sibbald C. *Alopecia Areata*: An Updated Review for 2023. *J Cutan Med Surg*. 2023 May-Jun;27(3):241-259. doi: 10.1177/12034754231168839. PMID: 37340563; PMCID: PMC10291119.
 63. Lolli F, Pallotti F, Rossi A, Fortuna MC, Caro G, Lenzi A, Sansone A, Lombardo F. Androgenetic *alopecia*: a review. *Endocrine*. 2017 Jul;57(1):9-17. doi: 10.1007/s12020-017-1280-y. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28349362.
 64. Sasaki GH. Review of Human Hair Follicle Biology: Dynamics of Niches and Stem Cell Regulation for Possible Therapeutic Hair Stimulation for Plastic Surgeons. *Aesthetic Plast Surg*. 2019 Feb;43(1):253-266. doi: 10.1007/s00266-018-1248-1. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30324295.
 65. Neuhaus K, Schiestl C, Adelsberger R, Weibel L, Meuli M, Böttcher-Haberzeth S. Bold to do - bald to be? Outcomes decades after harvesting the scalp in burned children. *Burns*. 2019 May;45(3):543-553. doi: 10.1016/j.burns.2018.09.023. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30337156.
 66. Almohanna HM, Perper M, Tosti A. Safety concerns when using novel medications to treat *alopecia*. *Expert Opin Drug Saf*. 2018 Nov;17(11):1115-1128. doi: 10.1080/14740338.2018.1533549. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30318935.
 67. Kubakov A.A., Yu.A. Gallyamova, Korableva O.A. and Kalinina P.A.. The Role of the VEGF, KGF, EGF, and TGF- β 1 Growth Factors in the Pathogenesis of Telogen Effluvium in Women. *Biomedical & Pharmacology Journal* Vol. 10(1), 2017: 191-198.
 68. Malkud S. Telogen Effluvium: A Review. *J Clin Diagn Res*. 2015 Sep;9(9):WE01-3. doi: 10.7860/JCDR/2015/15219.6492. Epub 2015 Sep 1. PMID: 26500992; PMCID: PMC4606321.
 69. Hughes Elizabeth C. ; Hasnain A. Syed ; Dahlia Saleh. *Telogen Efluvium*. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing* ; Januari 2024. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430848/>

70. Routsis C, Meletiadis J, Charitidou E, Gkoufa A, Kokkoris S, Karageorgiou S, Giannopoulos C, Koulenti D, Andrikogiannopoulos P, Perivolioti E, Argyropoulou A, Vasileiadis I, Vrioni G, Paramythiotou E. Epidemiology of Candidemia and Fluconazol Resistance in an ICU before and during the COVID-19 Pandemic Era. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Jun 4;11(6):771. doi: 10.3390/antibiotics11060771. PMID: 35740177; PMCID:PMC9219849
71. Ntarelli N, Gahoonia N, Sivamani RK. Integrative and Mechanistic Approach to the Hair Growth Cycle and Hair Loss. *J Clin Med*. 2023 Jan 23;12(3):893. doi: 10.3390/jcm12030893. PMID: 36769541; PMCID: PMC9917549.
72. 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 Rev Rep*. Published online 2021. doi:10.1007/s12015-020-10014-9
73. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25288114.
74. Riazifar M, Pone EJ, Lötvall J, Zhao W. Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2017 Jan 6;57:125-154. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-061616-030146. Epub 2016 Oct 28. PMID: 27814025; PMCID: PMC5360275.
75. Putra Agung. Basic Molecular Stem Cell. Unissula Press 2019. Hal 209-2011
76. Fan L. , Zhang C. , Yu Z. , Shi Z. , Dang X. , dan Wang K. , Transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang yang dikondisikan terlebih dahulu oleh hipoxia meningkatkan angiogenesis dan osteogenesis pada osteonekrosis kepala femur kelinci , *Bone* . (2015) **81** , 544 – 553 , <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.09.005> , 2-s2.0-84941787799.
77. Anderson JD , Johansson HJ , Graham CS , Vesterlund M. , Pham MT , Bramlett CS , Montgomery EN , Mellema MS , Bardini RL , Contreras

- Z. , Hoon M. , Bauer G. , Fink KD , Fury B. , Hendrix KJ , Chedin F. , el-Andaloussi S. , Hwang B. , Mulligan MS , Lehtiö J. , dan Nolta JA , Analisis proteomik komprehensif exosome sel punca mesenkimal mengungkap modulasi angiogenesis melalui pensinyalan faktor-kappaB nuklir , *Sel Punca* . (2016) **34** , no. 3, 601 – 613 , <https://doi.org/10.1002/stem.2298> , 2-s2.0-84975745595.
78. Liu W. , Li L. , Rong Y. , Qian D. , Chen J. , Zhou Z. , Luo Y. , Jiang D. , Cheng L. , Zhao S. , Kong F. , Wang J. , Zhou Z. , Xu T. , Gong F. , Huang Y. , Gu C. , Zhao X. , Bai J. , Wang F. , Zhao W. , Zhang L. , Li X. , Yin G. , Fan J. , dan Cai W. , Exosome yang berasal dari sel punca mesenkimal hipoxia meningkatkan penyembuhan patah tulang melalui transfer miR-126 , *Acta Biomaterialia* . (2020) **103** , 196 – 212 , <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.020>
 79. 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). doi:10.3390/cells11020202
 80. Zhang X, Bao P, Zheng Q, *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). doi:10.3390/cells11243985
 81. Winkler I, Engler JB, Vieira V, *et al*. MicroRNA-92a-CPEB3 axis protects neurons against inflammatory neurodegeneration. *Sci Adv*. 2023;9(47). doi:10.1126/SCIADV.ADI6855
 82. Liao Z, Zheng R, Shao G. Mechanisms and application strategies of miRNA-146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review). *Int J Mol Med*. 2023;51(1). doi:10.3892/ijmm.2022.5210
 83. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology*. 2010;190(6):1079-1091. doi:10.1083/jcb.201002049

84. Choi JS, Yoon HI, Lee KS, *et al.* Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *Journal of Controlled Release*. Published online 2016. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.018
85. Ruvolo PP, Jacamo R, Ruvolo VR, *et al.* Exosomes Mediate Communication Between the Microenvironment and Leukemic Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2012;120(21):3469-3469. doi:10.1182/blood.v120.21.3469.3469
86. 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). doi:10.1186/s13287-020-01639-1
87. Kang K, Ma R, Cai W, *et al.* Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote Cardioprotection via Akt Signaling Pathway following Myocardial Infarction. *Stem Cells Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/659890
88. 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):1203-1217. doi:10.1111/joa.13365
89. 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.
90. 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.
91. Garg S, Manchanda S. Platelet-rich plasma-an 'Elixir' for treatment of alopecia: personal experience on 117 patients with review of literature. *Stem Cell Invest*, 2017.

92. Tomita Y, Akiyama M, Shimizu H. PDGF isoforms induce and maintain anagen phase of murine hair follicles. *J Dermatol Sci*. 2006.
93. Ren, Jie, Sun, Jingxuan, Li, Zhenghui, Zhao, Yi, Tuan, Hsiaohan, 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.
94. 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.
95. Pratt CH, King LE Jr, Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. *Alopecia areata*. *Nat Rev Dis Primers*. 2017.
96. 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) Sarah E. Millar, Molecular Mechanisms Regulating Hair Follicle Development, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 118, Issue 2, 2002.
97. 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.
98. 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. 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.
99. Singh S, Muthuvel K. Practical Approach to Hair Loss Diagnosis. *Indian J Plast Surg*. 2021. 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.
 100. *Alopecia Areata*: Case report and review of pathophysiology and treatment 79 with Jak inhibitors, *Journal of Autoimmunity*, Volume 133, 2022
 101. 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.
 102. Choi, Y.M., Choi, S.Y., Kim, H. et al. TGF β family mimetic peptide promotes proliferation of human hair follicle dermal papilla cells and hair growth in C57BL/6 mice. *biomed dermatol* 2, 23 (2018).
 103. 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.
 104. Wu, X., Li, T., Jiang, R. et al. Targeting MHC-I molecules for cancer: function, mechanism, and therapeutic prospects. *Mol Cancer* 22, 194.2023.
 105. 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.
 106. Voskoboinik, I., Whisstock, J. & Trapani, J. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15, 388–400 2015.
 107. 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.

108. 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.
109. 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>
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.