

**PENGARUH *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS*
(SH-MSC) DAN MINOXIDIL TERHADAP KADAR IL-6 dan IL-10
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus model *Alopecia-like* yang diinduksi
Fluconazole)**

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



Magister Ilmu Biomedik

**Aristida Cahyono Putro
MBK2423010429**

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

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

**PENGARUH SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS
(SH-MSC) DAN MINOXIDIL TERHADAP KADAR IL-6 dan IL-10
(Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus model *Alopecia-like* yang diinduksi
Fluconazole)**

Disusun oleh :

Aristida Cahyono Putro

MBK2423010429

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada

Tanggal 21 Agustus 2025

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,

Pembimbing II,

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

NIK. 210123160

Dr.dr. Hadi Sarosa, M.Kes

NIK. 210.101.059

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung



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

NIK. 210123160

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, 28 Agustus 2025



(Aristida Cahyono Putro)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Aristida Cahyono Putro, Sp.
OT, AIFO -K, FICS
Tempat / tanggal lahir :Yogyakarta, 24 Oktober 1990
Agama : Katholik
Jenis Kelamin : Laki - laki

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Mater Dei Yogyakarta : Lulus tahun 1996
2. SD Marsudirini Yogyakarta : Lulus tahun 2002
3. SMP Xaverius 1 Palembang : Lulus tahun 2005
4. SMA Xaverius 1 Palembang : Lulus tahun 2008
5. S1 Fakultas Kedokteran UGM : Lulus tahun 2012
6. Profesi Dokter UGM : Lulus tahun 2014
7. Spesialis Orthopaedi UGM : Lulus tahun 2023
8. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : 2024 - Sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Istri : dr. Fabiola Supit
2. Nama Anak : Mattea Ariella Cahyono

KATA PENGANTAR

Puji syukur terpanjatkan kepada Tuhan atas segala karunia dan berkat-NYA, sehingga proposal tesis dengan judul **“Pengaruh Secretome *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSC) dan Minoxidil Terhadap Kadar IL-6 Dan IL-10 (Studi eksperimental *In Vivo* Pada Tikus model *Alopecia-like* yang diinduksi Fluconazole)”** ini dapat penulis selesaikan.

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

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

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. H. Gunarto, SH, MH
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak DR. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B
4. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing pertama.
5. Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
6. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
7. Segenap staf administrasi progam Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
8. Kedua orang tua dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doanya.

9. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

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

Semarang, 15 Agustus 2025

Penulis

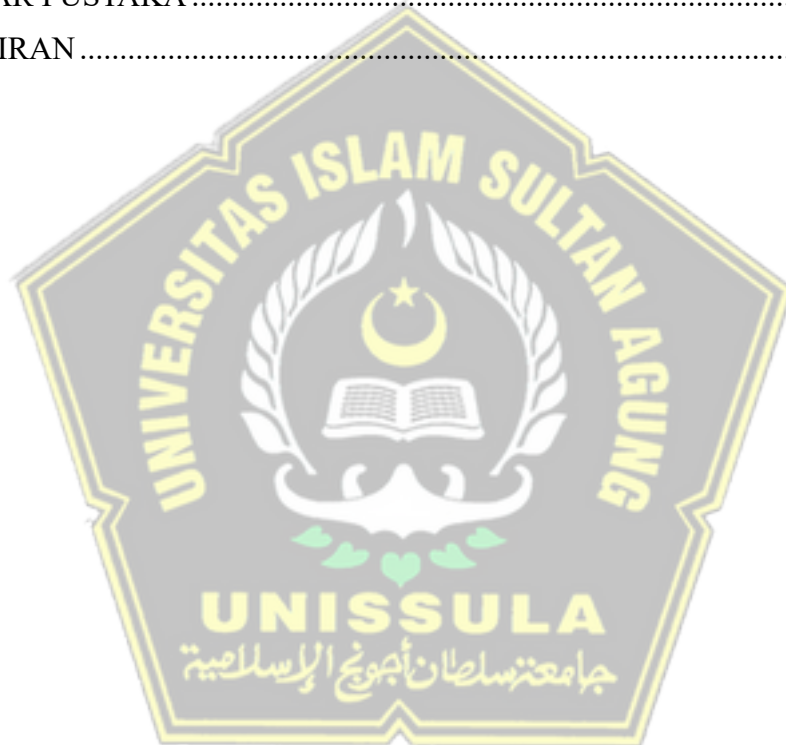
(Aristida Cahyono Putro)



DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	xii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR SINGKATAN	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Originalitas Penelitian	4
1.5. Manfaat penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Alopecia	7
2.2. Interleukin 6	10
2.4. Minoxidil	18
2.5. <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (SH-MSC)</i>	21
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	29
3.1. Kerangka Teori	29
3.2. Kerangka konsep	34
BAB IV METODE PENELITIAN	35
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	35
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	36
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	38
4.4. Besar Sampel	39
4.5. Alat dan Bahan	40
4.6. Cara Penelitian	41
4.7. Alur Penelitian	46

4.8. Analisa Data	48
4.9. Tempat dan Waktu Penelitian	48
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	49
5.1. Hasil Penelitian	49
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	59
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	65
6.1. Kesimpulan.....	65
6.2. Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN	73



DAFTAR SINGKATAN

AA	: <i>Alopecia Areata</i>
A-PRP	: <i>Non activated Platelet-Rich Plasma</i>
AA-PRP	: <i>Autologous Activated Platelet-Rich Plasma</i>
ADSC-Exos	: <i>Adipose-Derived Stem Cell Secretomes</i>
BMPs	: <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
GDFs	: <i>Growth Differentiation Factors</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
IL-10	: <i>Interluekin-10</i>
IGF	: <i>Insulin-Like Growth Factor</i>
MAPK/ERK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase / Extracellular-Signal-Regulated Kinase</i>
miRNA	: <i>Micro Ribonucleic Acid</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NF-kB	: <i>Nuclear Factor-Kappa Beta</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGF-A	: <i>Platelet-Derived Growth Factor A</i>
PDGF-AA	: <i>Platelet-Derived Growth Factor-AA</i>
PDGF-BB	: <i>Platelet-Derived Growth Factor-BB</i>
PEG	: <i>Polyethylene Glycol</i>
PI3K/AKT	: <i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SH-MSC	: <i>Secretome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
T reg	: <i>Regulatory T Cell</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1)</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Kerusakan immune pada alopecia areata ¹⁵	9
Gambar 2. 2. Penampakan infiltrat inflamasi "Swarm of Bees" ¹⁵	10
Gambar 2. 3. Jenis Sel Mensekresi IL-6 ²¹	12
Gambar 3. 1. Kerangka Teori	33
Gambar 3. 2. Kerangka Konsep	34
Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian ⁶⁷	35
Gambar 4. 2. Alur Penelitian	47
Gambar 5.1. Morfologi MSC.	51
Gambar 5.2. Kemampuan Diferensiasi MSCs.	52
Gambar 5.3. Validasi Makroskopis <i>Alopecia-like</i>	53
Gambar 5. 4. Validasi Mikroskopis <i>Alopecia-like</i> T	55
Gambar 5. 5. Grafik Kadar IL-6	57
Gambar 5. 6. Grafik Kadar IL-10	59



DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1. Originalitas Penelitian	4
Tabel 5. 1.Data Hasil Analisis Kadar IL-6	55
Tabel 5. 2. Uji <i>Post hoc</i> LSD Kadar IL-6.....	56
Tabel 5.3. Data Hasil Analisis Kadar IL-10	58
Tabel 5. 4. Uji <i>Post hoc</i> LSD Kadar IL-10.....	58



ABSTRAK

Latar Belakang : Alopecia ditandai oleh ketidakseimbangan imun, dengan peningkatan IL-6 dan penurunan IL-10. Minoxidil telah lama digunakan, namun tidak cukup efektif mengendalikan inflamasi. Penelitian ini mengevaluasi peran SH-MSC, sendiri maupun bersama minoxidil, terhadap ekspresi IL-6 dan IL-10 pada tikus model alopecia-like

Metode : Hewan coba berupa tikus jantan Wistar diinduksi menggunakan fluconazole secara oral selama 14 hari. Selanjutnya, tikus dibagi ke dalam empat kelompok, yaitu K1 (kontrol dengan larutan NaCl), K2 (perlakuan minoxidil), K3 (injeksi 100 μ L sekretom SH-MSC), dan K4 (kombinasi injeksi 100 μ L SH-MSC bersama minoxidil). Sekretom diberikan melalui jalur intradermal selama tujuh hari berturut-turut. Dua puluh empat jam setelah perlakuan terakhir, jaringan diambil untuk pemeriksaan kadar IL-6 dan IL-10 dengan metode ELISA. Data dianalisis menggunakan uji One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD, dengan batas signifikansi ditentukan pada $P < 0,05$.

Hasil : Hasil menunjukkan penurunan kadar IL-6 pada K1 ($4,81 \pm 0,41$ pg/mL), K2 ($3,82 \pm 0,26$), K3 ($2,98 \pm 0,18$), K4 ($1,62 \pm 0,38$), serta peningkatan kadar IL-10 pada K1 ($0,31 \pm 0,13$), K2 ($1,54 \pm 0,26$), K3 ($2,83 \pm 0,30$), K4 ($4,20 \pm 0,16$). Hasil menunjukkan pemberian kombinasi injeksi SH-MSC 100 uL dan Minoxidil 5% topical mampu menekan kadar IL-6 dan meningkatkan kadar IL-10 secara signifikan ($P < 0,05$).

Kesimpulan : Kesimpulannya, kombinasi sekretom MSC hipoksia dan minoxidil memberikan efek paling optimal dalam menekan IL-6 sekaligus meningkatkan IL-10, sehingga berpotensi sebagai strategi terapi alopecia berbasis imunomodulasi.

Kata Kunci : Alopecia, SH-MSC, IL-6, IL-10

ABSTRACT

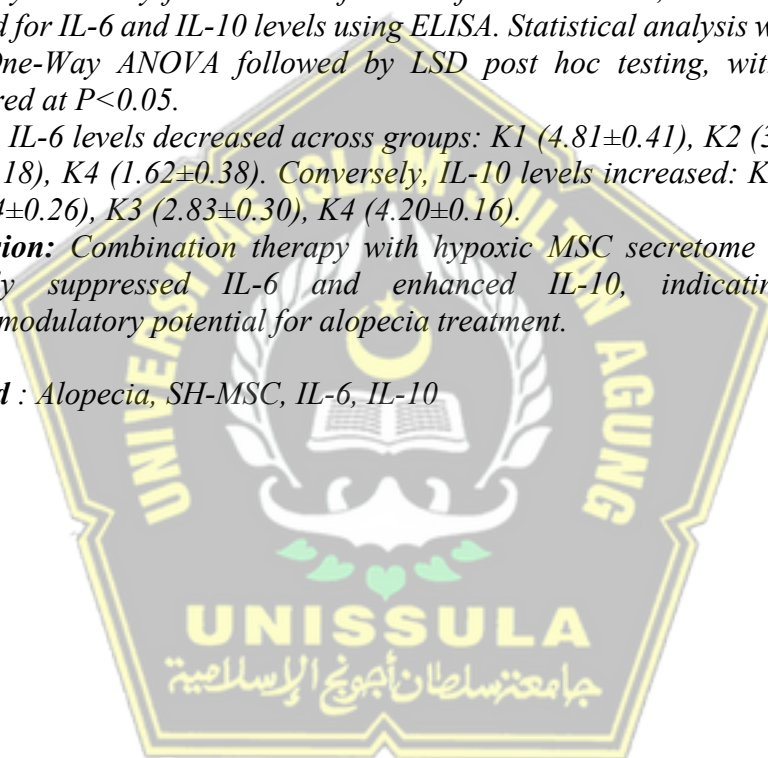
Background: Alopecia involves immune dysregulation characterized by elevated pro-inflammatory cytokines (IL-6) and reduced anti-inflammatory cytokines (IL-10). Minoxidil remains the standard therapy, but its limited immunomodulatory effects necessitate alternative approaches. Hypoxia-conditioned mesenchymal stem cell (MSC) secretome has been proposed as a novel therapeutic strategy.

Methods: Male Wistar rats were orally induced with fluconazole for 14 days and subsequently divided into four groups: K1 (NaCl control), K2 (minoxidil), K3 (injection of 100 μ L SH-MSC), and K4 (combination of 100 μ L SH-MSC injection with minoxidil). Secretome administration was performed via intradermal injection for 7 days. Twenty-four hours after the final treatment, tissue samples were analyzed for IL-6 and IL-10 levels using ELISA. Statistical analysis was carried out using One-Way ANOVA followed by LSD post hoc testing, with significance considered at $P < 0.05$.

Results: IL-6 levels decreased across groups: K1 (4.81 ± 0.41), K2 (3.82 ± 0.26), K3 (2.98 ± 0.18), K4 (1.62 ± 0.38). Conversely, IL-10 levels increased: K1 (0.31 ± 0.13), K2 (1.54 ± 0.26), K3 (2.83 ± 0.30), K4 (4.20 ± 0.16).

Conclusion: Combination therapy with hypoxic MSC secretome and minoxidil optimally suppressed IL-6 and enhanced IL-10, indicating promising immunomodulatory potential for alopecia treatment.

Keyword : Alopecia, SH-MSC, IL-6, IL-10



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alopecia adalah kondisi penipisan rambut secara tiba-tiba dan berlebihan yang terjadi ketika siklus pertumbuhan rambut menjadi terganggu dan menyebabkan lebih banyak rambut masuk ke dalam fase telogen dan kemudian rontok. Salah satu faktor yang berperan dalam progresivitas alopecia adalah Interleukin-6 (IL-6), sebuah sitokin pro-inflamasi yang dapat memicu peradangan di sekitar folikel rambut dan mengganggu aktivitas sel induk rambut, sehingga mempercepat transisi ke fase telogen.¹ Penelitian lain mengungkapkan bahwa IL-10 dapat menekan sekresi IL-6 dengan cara menghambat aktivasi Nf-kB.² Terapi standar yang umum digunakan untuk alopecia adalah minoksidil topikal. Mekanisme kerja utama minoksidil adalah sebagai vasodilator yang meningkatkan suplai nutrisi ke area folikel rambut, sehingga dapat menurunkan tingkat apoptosis sel folikel. Minoksidil tidak mampu menekan kadar interleukin-6 (IL-6), yang merupakan sitokin proinflamasi yang berperan penting dalam patogenesis dan progresivitas alopecia. Di sisi lain, sekretom yang dihasilkan oleh *Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSC) menunjukkan potensi besar sebagai terapi alopecia, karena memiliki kemampuan menurunkan kadar protein-protein inflamasi, termasuk IL-6, sehingga berkontribusi dalam menghambat proses inflamasi yang mendasari kerontokan rambut.³⁻⁸ Penelitian tentang kombinasi antara SH-MSC dan minoxidil topikal pada alopecia yang dikaji dari kadar IL-6 dan IL-10 pada

tikus model *Alopecia-like* masih belum dilakukan, oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh kombinasi SH-MSC dan minoxidil terhadap kadar IL-6 dan IL-10 pada Alopecia.

Interleukin-6 merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang diketahui berperan penting dalam patogenesis berbagai kondisi inflamasi kronis, termasuk alopecia. Pada kondisi alopecia, peningkatan kadar IL-6 dapat menghambat proliferasi sel papila dermal dan mengganggu siklus pertumbuhan rambut dengan mendorong fase katagen secara prematur. Jika kadar IL-6 tidak berhasil ditekan, maka proses inflamasi kronis akan terus berlangsung, yang pada akhirnya memperparah kerusakan folikel rambut dan memperlambat proses regenerasi. Hal ini menyebabkan respon terhadap terapi menjadi suboptimal, memperpanjang durasi pengobatan, dan berpotensi meningkatkan risiko terjadinya alopecia irreversible. Oleh karena itu, mengendalikan kadar IL-6 menjadi salah satu target penting dalam pengembangan terapi yang efektif untuk alopecia. Terapi standar berupa Minoxidil efektif meningkatkan aliran darah dan pertumbuhan rambut, namun tidak mampu menekan protein inflamasi seperti IL-6, sehingga inflamasi akan terus berlanjut yang menyebabkan kekambuhan pada terapi ini.⁹⁻¹²

Salah satu pendekatan terapeutik yang menjanjikan untuk menekan kadar IL-6 pada alopecia adalah pemanfaatan sekretom hipoksia dari SH-MSC. Beberapa terdahulu menemukan bahwa SH-MSC mengandung seperti Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Hepatocyte Growth factor (HGF), Prostaglandin E2 (PGE2), dan IL-10 yang bersifat anti inflamasi. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yang

menemukan bahwa SH-MSC mampu menekan protein-protein inflamasi seperti IL-6 dan IFN- γ pada tikus model alopecia. Penelitian tersebut masih belum mengkombinasikan minoxidil yang merupakan terapi standar yang mungkin dapat meningkatkan efek antiinflamasi SH-MSC terhadap alopecia. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji peran kombinasi antara SH-MSC dan minoxidil terhadap kadar IL-6 dan IL-10 pada kondisi alopecia.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh kombinasi injeksi intradermal SH-MSC 100 μ L dan minoxidil 5% topikal terhadap kadar IL-6 dan IL-10 pada Tikus model *Alopecia-like* yang diinduksi Fluconazole?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Mengetahui pengaruh kombinasi injeksi intradermal SH-MSC 100 μ L dan minoxidil 5% topikal terhadap kadar IL-6 dan IL-10 tikus model *Alopecia-like* yang diinduksi Fluconazole.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Membuktikan pengaruh injeksi intradermal SH-MSC 100 μ L dan minoxidil 5% topikal terhadap kadar IL-6 pada tikus jantan galur Wistar model *alopecia like*.
- b. Membuktikan pengaruh injeksi intradermal SH-MSC 100 μ L dan minoxidil 5% topikal terhadap kadar IL-10 pada tikus jantan galur Wistar model *alopecia like*..

1.4.Originalitas Penelitian

Tabel 1. 1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Sampel dan Metode	Hasil
1.	Indah Permata Hati, 2023	Pengaruh Pemberian Topikal Secretome <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i> Terhadap Ekspresi Gen Il-10 Dan Tnf-A	In vivo tikus mengalami alopecia yang diberi fluconazole dan diuji IL-10 dan TNF- α	Pemberian dosis topikal SH-MSCs meningkatkan ekspresi gen IL-10 dan menurunkan ekspresi gen TNF- α pada tikus Wistar dengan model alopesia like yang diinduksi fluconazole
2.	Meri Aldila Rahmanita, 2023	Pengaruh Pemberian Topikal Secretome <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i> Terhadap Ekspresi Gen Il-6 dan TGF-B	In vivo tikus mengalami alopecia yang diberi fluconazole dan diuji IL-6 dan TGF-B	Pemberian dosis SH-MSCs 10% dan 20% dalam 200 mg gel dapat menurunkan ekspresi IL-6. Pemberian dosis SH-MSCs 20%meningkatkan ekspresi TGF- β pada tikus <i>Alopecia-like</i>
3.	Yanqiao Li et al, 2022 ¹³	<i>Exosomes Secreted from Adipose-Derived Stem Cells Are a Potential Treatment Agent for Immune-Mediated Alopecia</i>	Pemberian sekresi eksosom dari sel punca adiposa	Terapi ADSC-Exos meningkatkan pertumbuhan rambut dengan regulasi jalur pensinyalan miR-22, Wnt / β -catenin, dan TNF- α pada alopecia yang dimediasi imun.
4.	Jia Yi Ding et al, 2020 ¹⁵	<i>Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in skin wound healing: roles, opportunities and challenges</i>	Pemberian eksosom yang berasal dari <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSC)	Eksosom yang berasal dari MSC menunjukkan potensi besar dalam mempercepat penyembuhan luka, meregenerasi

			pembuluh darah, saraf, dan folikel rambut.
5.	Liang Y <i>et al</i> , 2023 ³	<i>Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Carrying MiR-122-5p Antagonize the Inhibitory Effect of Dihydrotestosterone on Hair Follicles by Targeting the TGF-β1/SMAD3 Signaling Pathway</i>	Pemberian miR-122-5p dalam eksosom meningkatkan regulasi ekspresi β -catenin dan versican dengan menargetkan SMAD3 in vivo dan in vitro.
6	Santos <i>et al</i> , 2020	<i>Topikal minoxidil-loaded nanotechnology strategies for alopecia</i>	Pemberian minoxidil dengan ukuran nano dapat meningkatkan jumlah folikel rambut

Penelitian ini memiliki kebaruan dalam menggabungkan injeksi intradermal secretome *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) dengan minoxidil sebagai terapi kombinasi untuk alopecia, yang belum pernah dieksplorasi dalam studi sebelumnya. Berbeda dengan penelitian terdahulu yang umumnya menggunakan secretome MSC dalam bentuk topikal (Indah Permata Hati, 2023; Meri Aldila Rahmanita, 2023) atau fokus pada eksosom tanpa kombinasi farmakologis (Yanqiao Li *et al.*, 2022; Jia Yi Ding *et al.*, 2020; Liang Y *et al.*, 2023), serta penelitian minoxidil yang terbatas pada formulasi topikal (Santos *et al.*, 2020),

studi ini menawarkan pendekatan sinergis yang memanfaatkan efek regeneratif dan imunomodulator secretome MSC serta efek stimulasi folikel rambut dari minoxidil melalui rute injeksi langsung, sehingga berpotensi meningkatkan efektivitas terapi pertumbuhan rambut secara signifikan.

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis:

- a. Pengembangan Pengetahuan tentang Regulasi Molekuler pada Alopecia
Penelitian ini dapat memperluas pemahaman tentang peran IL-6 dan IL-10 dalam patogenesis alopecia serta kontribusi SH-MSC dalam modulasi siklus rambut dan peradangan.
- b. Hasil penelitian ini memberikan bukti ilmiah baru mengenai potensi SH-MSC sebagai agen terapeutik inovatif dalam bidang bioteknologi, khususnya dalam pengobatan berbasis sel punca.
- c. Temuan penelitian ini dapat menjadi dasar untuk mengembangkan terapi molekuler yang lebih efektif, berbasis pada regulasi spesifik IL-6 dan IL-10 pada alopecia.

1.5.2. Manfaat Praktis:

- a. Penelitian ini menawarkan pendekatan berupa terapi kombinasi antara injeksi intradermal SH-MSC dan minoxidil dengan efektivitas yang lebih tinggi dan risiko efek samping yang lebih rendah.
- b. Penelitian ini berpotensi mendorong pengembangan produk farmasi berbasis SH-MSC untuk meningkatkan pertumbuhan rambut secara alami dan berkelanjutan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alopecia

2.1.1. Definisi

Alopecia adalah kondisi kerontokan rambut yang *reversible* dan umum terjadi.¹⁴ Biasanya, kondisi ini ditandai dengan area kerontokan total rambut di kulit kepala dan bagian tubuh lainnya, yang dalam beberapa kasus dapat menyebabkan kerontokan seluruh rambut tubuh. Laki-laki dan perempuan memiliki risiko yang sama untuk mengalami kondisi ini, namun beberapa data menunjukkan bahwa laki-laki lebih mungkin mendapatkan diagnosis dini dibandingkan perempuan pada masa remaja, terutama jika ada keterlibatan kuku dan penyakit autoimun. Prevalensi kondisi ini berkisar antara 0,1% hingga 0,2% secara global.¹⁵

2.1.2. Alopecia areata (AA)

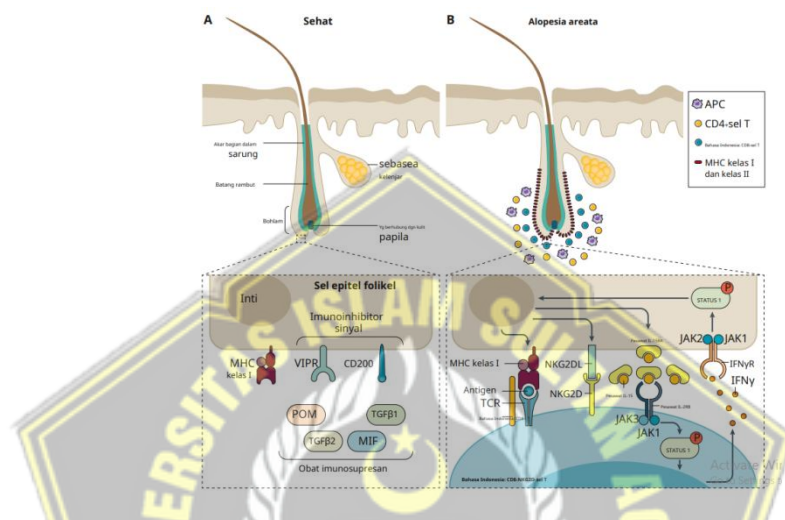
Secara klinis, alopecia areata memiliki berbagai bentuk manifestasi.¹⁵ Patchy alopecia ditandai dengan kerontokan rambut yang terlokalisasi pada satu atau beberapa bercak di kulit kepala. Diffuse alopecia menunjukkan pola kerontokan menyebar di seluruh area kulit kepala. Alopecia areata reticularis ditandai oleh pola kerontokan menyerupai jaringan retikular tanpa adanya lesi botak yang terdefinisi dengan jelas. Perinevoid alopecia areata merupakan bentuk tidak merata dari alopecia yang terjadi di sekitar nevus melanositik pada area yang mengalami kerontokan. Ophiasis alopecia areata ditandai dengan kerontokan yang terjadi di bagian lateral dan oksipital kulit kepala, sedangkan sisaipho

alopecia areata, yang dianggap sebagai bentuk kebalikan dari ophiasis, tidak mengenai bagian tersebut.¹⁵

Alopecia areata secara umum ditandai dengan kerontokan rambut non-sikatrik berbentuk oval atau sirkular, yang dapat mengalami remisi spontan atau eksaserbasi¹⁵ Lesi sering kali memperlihatkan rambut berbentuk exclamation point di tepinya—rambut pendek dan rapuh dengan bagian distal lebih lebar dari proksimal. Kulit pada area yang terkena tampak halus dan minim rambut, dengan lokasi yang umum meliputi kulit kepala (sekitar 90% kasus), alis, bulu mata, janggut, rambut tubuh, ketiak, dan area pubis. Beberapa pasien melaporkan sensasi pruritus atau terbakar sebelum kerontokan. Abnormalitas kuku, seperti pitting atau onikolisis, juga dapat muncul dan bisa bersifat reversibel maupun persisten.¹⁵

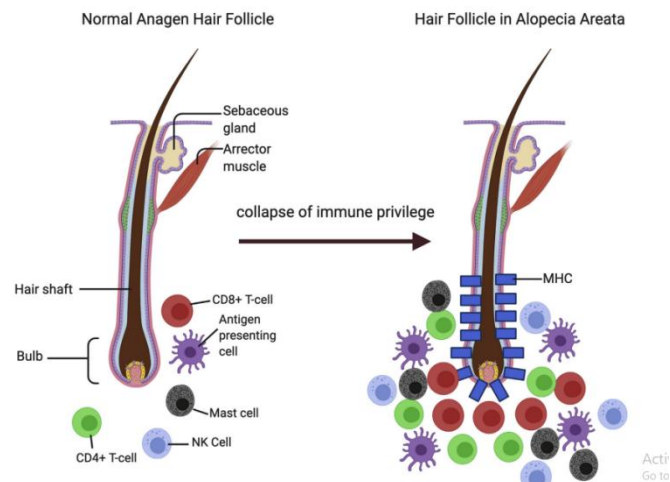
Secara imunologis, folikel rambut berada dalam kondisi *immune privilege* yang dicapai melalui berbagai mekanisme, seperti penurunan ekspresi MHC kelas I dan β 2-mikroglobulin, produksi lokal zat immunosupresif, ekspresi molekul immunoinhibitor seperti CD200, serta penekanan aktivitas sel penyaji antigen (APC), sel mast, dan sel natural killer (NK).¹⁵ Neuropeptida seperti vasoactive intestinal peptide (VIP), yang dilepaskan oleh serabut saraf sensorik perifolikular, turut berperan dalam mempertahankan status imun ini. Pada pasien alopecia areata, ditemukan peningkatan kadar IL-6 dan dibuktikan dengan adanya infiltrasi sel imun seperti APC, sel T CD4⁺ dan CD8⁺, serta ekspresi abnormal MHC kelas I dan II di sekitar folikel rambut anagen akhir.¹⁵ Sel T CD8⁺ bahkan dapat menyusup ke dalam selubung akar folikel.¹⁵ Berbagai

molekul yang berperan dalam kaskade ko-stimulasi limfosit, seperti IFN- γ , JAK1/STAT, IL-6, dan NKG2D, diyakini memiliki peran penting dalam patogenesis penyakit ini dan menjadi target potensial untuk terapi imunomodulasi, termasuk terapi yang menargetkan peningkatan produksi protein antiinflamasi termasuk IL-10.¹⁵



Gambar 2. 1. Kerusakan immune pada alopecia areata¹⁵

Pada folikel rambut alopecia areata, diyakini bahwa peningkatan aktivitas MHC kelas I dan MHC kelas II dikaitkan dengan perekrutan leukosit ke umbi rambut. Gambar diatas menggambarkan runtuhnya hak istimewa kekebalan folikel rambut, yang menyebabkan segerombolan sel CD8⁺ Sel T, CD4⁺ Sel T, sel penyaji antigen, dan sel mast yang mengelilingi folikel. Sel imunoinflamasi ini menyebabkan gangguan siklus pertumbuhan rambut dan kerusakan folikel.¹⁵



Gambar 2. 2. Penampakan infiltrat inflamasi "Swarm of Bees"¹⁵

2.2. Interleukin 6

2.2.1. Definisi IL-6

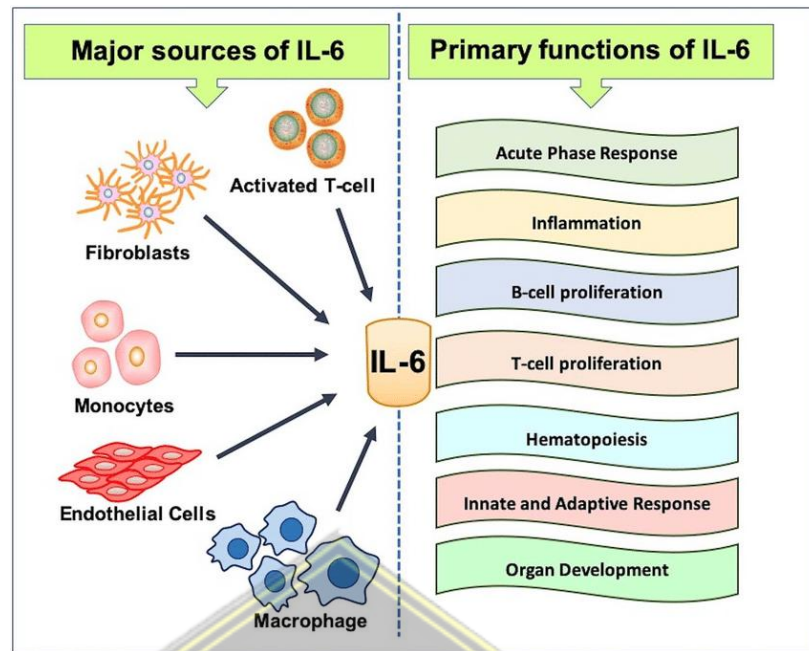
Interleukin-6 adalah sitokin pleiotropik yang memiliki peran penting dalam berbagai proses biologis, termasuk inflamasi, respons imun, hematopoiesis, metabolisme energi, dan regenerasi jaringan.¹⁶⁻¹⁸ IL-6 pertama kali diidentifikasi sebagai faktor penginduksi sel B untuk menghasilkan imunoglobulin, tetapi penelitian lebih lanjut mengungkapkan bahwa IL-6 juga berperan dalam mengatur respons imun bawaan dan adaptif. IL-6 menjadi pusat perhatian dalam berbagai penyakit, seperti penyakit inflamasi kronis, infeksi, kanker, dan gangguan autoimun, karena aktivitasnya yang luas dalam sistem tubuh.¹⁶⁻¹⁸

Secara kimia, IL-6 adalah glikoprotein dengan panjang 212 asam amino dan berat molekul sekitar 26 kDa.^{19,20} Molekul ini memiliki struktur berbentuk empat heliks panjang yang diatur dalam konfigurasi heliks antiparalel. Struktur tersebut memungkinkan IL-6 berinteraksi dengan

reseptor spesifiknya, yaitu IL-6R dan gK330, untuk memediasi sinyal di dalam sel.^{19,20} IL-6 termasuk dalam keluarga gK330 receptor cytokine family, yang mencakup sitokin lain seperti *leukemia inhibitory factor* (LIF), oncostatin M (OSM), dan *ciliary neurotrophic factor* (CNTF). Semua anggota keluarga ini menggunakan gK330 sebagai komponen transduksi sinyal utama.^{19,20}

2.2.2. Jenis Sel yang Mensekresikan IL-6

IL-6 dihasilkan oleh berbagai jenis sel, baik dalam kondisi homeostasis maupun selama fase patologis.²¹ Jenis sel yang paling sering mengeluarkan IL-6 meliputi makrofag, sel T, dan sel B (Gambar 2.1). Selain itu, sel-sel struktural seperti fibroblas, sel endotel, dan sel epitel juga mampu memproduksi IL-6, terutama saat terpapar rangsangan inflamasi. Sel otot rangka dan adiposit juga diketahui menghasilkan IL-6 dalam konteks metabolisme dan aktivitas fisik. Dalam kondisi stres atau kerusakan jaringan, sel mast, dendritik, dan neutrofil juga dapat berkontribusi pada produksi IL-6.²¹



Gambar 2. 3. Jenis Sel Mensekresi IL-6²¹

2.2.3. Proses Sekresi IL-6

Proses sekresi IL-6 dimulai dengan aktivasi sel-sel penghasil oleh rangsangan tertentu. Rangsangan ini bisa berupa pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), seperti lipopolisakarida (LPS) dari bakteri, atau damage-associated molecular patterns (DAMPs), seperti molekul endogen yang dilepaskan selama kerusakan jaringan. Rangsangan ini mengaktifkan jalur pensinyalan intraseluler, terutama jalur NF- κ B, MAPK, atau JAK/STAT, yang kemudian menginduksi ekspresi gen IL-6.²²

Setelah sintesis di retikulum endoplasma, IL-6 mengalami modifikasi pascatranslasi, seperti glikosilasi, untuk memastikan stabilitas dan fungsionalitasnya. Molekul IL-6 yang matang kemudian dikemas dalam vesikel sekretori dan dilepaskan ke lingkungan mikro ekstraseluler. Dalam lingkungan tersebut, IL-6 berinteraksi dengan reseptor spesifik di

permukaan sel target, memulai serangkaian proses biologis yang kompleks. Penting untuk dicatat bahwa sekresi IL-6 sering diatur oleh umpan balik positif atau negatif untuk memastikan respons inflamasi yang terkendali.²³

2.2.4. Peran Fisiologis dan Patologis IL-6

Dalam kondisi fisiologis, IL-6 membantu dalam regenerasi jaringan, respons imun terhadap infeksi, dan regulasi metabolisme energi.²⁴ Produksi IL-6 yang berlebihan atau tidak terkendali dapat menyebabkan berbagai gangguan patologis. IL-6 berkontribusi pada patogenesis penyakit inflamasi kronis, seperti rheumatoid arthritis dan penyakit Crohn, serta gangguan metabolik, termasuk obesitas dan diabetes tipe 2.^{18,25}

2.2.5. Peran IL-6 dalam Alopecia

IL-6 juga memiliki peran penting dalam kondisi kulit, termasuk alopecia. Dalam alopecia, IL-6 dapat memengaruhi mikrolingkungan folikel rambut dengan cara meningkatkan peradangan dan merusak siklus pertumbuhan rambut.²⁶⁻²⁸ Produksi IL-6 yang tinggi di sekitar folikel rambut dapat menyebabkan transisi dini dari fase anagen ke fase telogen, yang berujung pada kerontokan rambut. Oleh karena itu, menargetkan IL-6 pada terapi dapat menjadi strategi potensial untuk mengatasi alopecia dan memodulasi peradangan yang terkait dengannya.²⁶⁻²⁸

2.3. Interleukin 10

2.3.1. Definisi

Interleukin-10 adalah sebuah sitokin antiinflamasi yang memiliki peran krusial dalam menjaga keseimbangan sistem imun. IL-10 dikenal sebagai “master regulator” dari respon imun karena kemampuannya dalam mengontrol peradangan berlebihan yang dapat merusak jaringan. Fungsi utama IL-10 adalah menekan ekspresi sitokin proinflamasi, menurunkan aktivitas antigen-presenting cells (APC), serta menghambat proliferasi dan aktivasi sel T efektor.

Secara struktural, IL-10 adalah protein homodimerik yang terdiri dari dua subunit identik, masing-masing dengan berat molekul sekitar 18 kDa.^{29–31} Protein ini tersusun dalam bentuk heliks alfa dan termasuk dalam keluarga kelas II sitokin, yang juga mencakup interferon dan IL-22. IL-10 berikatan dengan reseptor spesifiknya, yaitu IL-10R1 (reseptor afinitas tinggi) dan IL-10R2 (reseptor sinyal), yang secara bersama-sama mengaktifasi jalur pensinyalan JAK1/TYK2 dan STAT3, yang berujung pada regulasi transkripsi gen-gen target yang menghambat inflamasi.^{29–31}

Gen IL10 pada manusia terletak di kromosom 1q32.1. Ekspresinya diinduksi oleh berbagai stimulus imunologis dan non-imunologis, termasuk lipopolisakarida (LPS), IL-6, IL-27, dan kondisi mikro lingkungan seperti hipoksia atau stres oksidatif.^{29–31} Produksi IL-10 terutama berasal dari sel imun seperti sel T regulator (Treg), sel B, monosit, makrofag, dan sel dendritik.^{29–31}

IL-10 berfungsi dalam beberapa mekanisme termasuk menekan produksi sitokin proinflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6, dan IFN- γ . Selain itu protein ini juga dapat menghambat ekspresi molekul kostimulatorik pada APC (misalnya CD80/CD86), sehingga menurunkan aktivasi sel T, menurunkan kemampuan fagositosis dan presentasi antigen oleh makrofag dan sel dendritik dan meningkatkan diferensiasi dan fungsi sel T regulator (Treg), yang penting dalam toleransi imun.²⁹⁻³¹

2.3.2. Jenis Sel yang Mensekresikan IL-10

IL-10 (Interleukin-10) disekresikan oleh berbagai jenis sel imun dan non-imun, terutama dalam konteks respons imun, regulasi peradangan, dan pemeliharaan homeostasis jaringan. Berikut adalah jenis-jenis sel yang diketahui mensekresikan IL-10:

- Sel T Regulator (Treg) dan Subset Sel T

Sel T regulator merupakan produsen utama IL-10 dalam sistem imun adaptif. IL-10 yang disekresikan oleh Treg berfungsi menekan aktivasi sel T efektor dan mengendalikan reaksi imun berlebihan. Selain Treg, subset lain seperti sel T helper 2 (Th2), Tr1, dan Th17 juga dapat menghasilkan IL-10 dalam kondisi tertentu.²⁹⁻³¹

- Makrofag dan Monosit

Sel fagosit mononuklear ini mensekresikan IL-10 sebagai respons terhadap stimulasi patogen (misalnya LPS) atau sitokin proinflamasi. IL-10 dari makrofag berperan penting dalam menekan inflamasi lokal dan

mendorong pergeseran ke fenotipe makrofag M2 yang bersifat reparatif dan antiinflamasi.²⁹⁻³¹

- Sel Dendritik (DC)

Sebagai sel penyaji antigen profesional, sel dendritik dapat memproduksi IL-10 untuk menurunkan ekspresi molekul kostimulatorik dan sitokin proinflamasi, sehingga mengarahkan sistem imun ke arah toleransi atau respons yang lebih terkontrol.²⁹⁻³¹

- Sel B

Sel B pengatur (Breg) adalah subset dari sel B yang mensekresikan IL-10. Fungsi IL-10 dari sel ini adalah mengurangi aktivasi sel T dan makrofag, serta menjaga toleransi imun terhadap antigen self maupun non-self.²⁹⁻³¹

- Sel Epitel dan Sel Stroma

Dalam konteks inflamasi jaringan, sel-sel epitel (seperti epitel usus atau kulit) dan sel stroma lokal (misalnya fibroblas) juga dapat mensekresikan IL-10 sebagai bagian dari mekanisme perlindungan terhadap kerusakan jaringan dan untuk meredakan peradangan.²⁹⁻³¹

- Sel NK (Natural Killer)

Dalam situasi tertentu, seperti infeksi virus atau aktivasi imun yang kuat, sel NK juga dapat memproduksi IL-10. Peran IL-10 dari sel NK adalah membatasi kerusakan jaringan akibat aktivitas sitotoksik berlebihan.²⁹⁻³¹

Sekresi IL-10 dapat dipicu oleh sinyal imunologis seperti aktivasi reseptor Toll-like (TLR), paparan antigen, serta oleh sitokin lain seperti IL-6, IL-27, atau TGF- β . Proses ini dikendalikan melalui regulasi transkripsi

gen IL10 di kromosom 1q32.1, dan protein IL-10 yang terbentuk kemudian mengalami glikosilasi dan dimerisasi sebelum diekskresikan ke ruang ekstraseluler untuk menjalankan fungsi imunoregulatorinya.²⁹⁻³¹

2.2.2. Peran IL-10 dalam Alopecia

Peran IL-10 dalam kondisi alopecia telah menunjukkan bahwa sitokin ini memiliki efek protektif terhadap kerontokan rambut yang dipicu oleh peradangan.² IL-10 adalah sitokin antiinflamasi yang secara fisiologis bertugas menghambat produksi berbagai sitokin proinflamasi seperti IL-6, TNF- α , dan IL-1 β .^{30,32} Dalam model hewan *Alopecia-like*, peningkatan kadar IL-10 sering dihubungkan dengan penurunan inflamasi pada jaringan kulit kepala dan folikel rambut. Studi-studi menunjukkan bahwa kondisi inflamasi kronis dapat merusak mikrostruktur folikel rambut dan mengganggu fase anagen (pertumbuhan), sedangkan keberadaan IL-10 membantu mempertahankan lingkungan mikro yang stabil dan mendukung regenerasi folikel.^{2,33} Oleh karena itu, IL-10 dipandang sebagai salah satu kunci penting dalam menciptakan homeostasis imun di area kulit kepala.

Salah satu penelitian relevan dilakukan sebelumnya mengevaluasi pengaruh pemberian topikal secretome *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSC) terhadap ekspresi gen IL-10 dan TNF- α pada tikus model *Alopecia-like*.² Hasilnya menunjukkan bahwa aplikasi SH-MSC secara signifikan meningkatkan ekspresi IL-10 dan menurunkan ekspresi TNF- α . Hal ini menunjukkan bahwa IL-10 memainkan peran sentral dalam menekan inflamasi dan mendukung proses regeneratif di area folikel rambut yang mengalami kerusakan akibat induksi agen inflamasi (fluconazole).²

Penelitian ini menegaskan bahwa peningkatan ekspresi IL-10 dapat menjadi indikator efektivitas suatu terapi antiinflamasi pada alopecia. Temuan ini juga mendukung pendekatan terapi berbasis imunomodulasi sebagai strategi untuk menghambat perkembangan kerontokan rambut akibat inflamasi.²

Secara keseluruhan, IL-10 tidak hanya bertindak sebagai penekan inflamasi, tetapi juga mendukung regenerasi jaringan folikel rambut dengan menciptakan lingkungan yang bebas dari sitokin destruktif. Dalam konteks alopecia areata, suatu penyakit autoimun yang ditandai oleh serangan sistem imun terhadap folikel rambut, studi klinis dan preklinis juga menunjukkan bahwa kadar IL-10 yang rendah sering dikaitkan dengan eksaserbasi penyakit.³³ Sebaliknya, peningkatan kadar IL-10 terbukti membantu menormalkan siklus rambut dan mencegah kerusakan lanjutan. Oleh karena itu, IL-10 kini menjadi target penting dalam pengembangan terapi berbasis sel dan molekuler untuk gangguan pertumbuhan rambut yang disebabkan oleh inflamasi.

2.4. Minoxidil

2.4.1. Definisi

Minoxidil adalah senyawa kimia dengan nama sistematik 2,4-diamino-6-piperidinopyrimidine-3-oxide, yang memiliki rumus molekul $C_9H_{15}N_5O$ dan massa molekul sebesar 209,25 g/mol. Struktur kimianya terdiri dari cincin pirimidin dengan substituen gugus amino di posisi 2 dan 4, serta gugus piperidin di posisi 6 dan gugus oksida di posisi 3, yang berkontribusi terhadap mekanisme aksinya.³⁴

Minoxidil dikembangkan sebagai obat antihipertensi oral karena kemampuannya melebarkan pembuluh darah (vasodilatasi). Mekanisme aksi minoxidil sebagai vasodilator terutama berkaitan dengan aktivitasnya sebagai pembuka saluran kalium (K^+) ATP-sensitif pada membran sel otot polos vaskular. Aktivasi saluran ini menyebabkan keluarnya ion kalium dari dalam sel, yang kemudian memicu hiperpolarisasi membran, menghambat masuknya ion kalsium melalui saluran kalsium voltase-gated, dan akhirnya menyebabkan relaksasi otot polos vaskular, sehingga terjadi pelebaran pembuluh darah dan peningkatan aliran darah lokal.³⁴

Mekanisme pada penggunaan topikal untuk alopecia diyakini berperan dalam meningkatkan perfusi darah di sekitar folikel rambut, memperpanjang fase anagen, serta merangsang proliferasi sel papila dermal. Selain itu, beberapa studi menunjukkan bahwa minoxidil juga dapat meningkatkan ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF), yang berkontribusi pada proses *angiogenesis* dan nutrisi folikel rambut, sehingga mendukung pertumbuhan rambut yang lebih kuat dan sehat.^{9,35}

Penggunaan minoxidil dalam terapi alopecia mengalami perkembangan signifikan, baik dari segi formulasi maupun cara pemberian. Minoxidil topikal dalam konsentrasi 2% dan 5% masih menjadi terapi standar yang disetujui oleh FDA untuk alopecia androgenetik pada pria dan wanita.¹⁹ Obat ini bekerja melalui mekanisme vasodilatasi dengan membuka saluran kalium ATP-sensitif, sehingga meningkatkan aliran darah ke folikel rambut, memperpanjang fase anagen, dan merangsang pertumbuhan rambut.³⁶

Meski efektif, sediaan topikal ini sering menimbulkan efek samping lokal seperti iritasi kulit, dermatitis kontak, dan ketidaknyamanan akibat penggunaan yang harus rutin dan berkepanjangan.³⁵

Sebagai alternatif, minoxidil oral dosis rendah (*low-dose oral minoxidil*, LDOM) mulai digunakan secara off-label dengan hasil klinis yang menjanjikan.^{35,37} Pemberian LDOM dalam dosis 0,25 hingga 5 mg per hari telah menunjukkan peningkatan jumlah rambut terminal serta kepadatan rambut, dengan efek samping sistemik yang relatif ringan seperti hipertrikosis, edema, atau takikardia. Beberapa studi juga membandingkan efektivitas LDOM dengan sediaan topikal dan menunjukkan hasil yang sebanding atau bahkan superior.^{35,37} Selain itu, kombinasi minoxidil dengan agen lain, seperti spironolakton atau antiandrogen, sedang dikembangkan untuk meningkatkan hasil terapi, terutama pada kasus-kasus alopecia yang lebih berat atau refrakter. Dengan demikian, minoxidil tetap menjadi terapi utama dalam penatalaksanaan alopecia, dan pemilihan bentuk serta dosisnya perlu disesuaikan berdasarkan karakteristik klinis dan respons individual pasien.^{35,37}

2.4.2. Pengaruh Minoxidil terhadap IL-6 dan IL-10

Minoxidil bekerja sebagai agen vasodilator yang merangsang ekspresi VEGF, meningkatkan angiogenesis dan suplai darah ke folikel rambut,

sehingga mengurangi apoptosis dan memperpanjang fase anagen (pertumbuhan rambut).^{34,36,38} Pada kondisi kerusakan jaringan akibat induksi fluconazole seperti alopecia, sel yang rusak melepaskan DAMP yang mengaktifkan jalur sinyal inflamasi melalui reseptor seperti TLR, memicu aktivasi faktor transkripsi NF- κ B.³⁹ Aktivasi NF- κ B ini meningkatkan produksi sitokin proinflamasi seperti IL-6, yang berkontribusi pada peradangan lokal dan kerontokan rambut lebih lanjut. Sitokin ini juga mendorong polarisasi makrofag ke tipe M1, yang semakin memperparah peradangan melalui sekresi IL-6, TNF- α , dan ROS.⁴⁰

Konsumsi Minoxidil berperan terhadap berkurangnya sel-sel apoptosis, sehingga akan menurunkan jumlah DAMP yang berujung pada penurunan aktivasi Nf- κ B dan IL-6.^{34,36,38} Hal ini akan memicu aktivasi M1 menjadi Makrofag tipe M2.⁴¹ Makrofag tipe M2 memiliki peran antiinflamasi dan regeneratif dengan menghasilkan IL-10, sebuah sitokin yang menghambat aktivasi NF- κ B dan menurunkan kadar IL-6 sehingga berpotensi mengurangi inflamasi dan mendukung regenerasi jaringan folikel rambut.⁴¹

2.5. *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (SH-MSC)*

2.5.1. Definisi

Secretome hipoksia mesenchymal stem cell (MSC) adalah molekul aktif yang terdiri dari sitokin, *growth factor* dan vesikel ekstraseluler

berukuran 30-150 nm yang berperan dalam regenerasi jaringan, anti-inflamasi, dan modulasi imun, yang disekresikan oleh MSC pada kondisi hipoksia.⁴²⁻⁴⁴

2.5.2. Kandungan *SH-MSC*

Secretome mesenchymal stem cell 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 *SH-MSC* yang berkontribusi dalam mengatasi alopecia:

a. miRNA (*MicroRNA*)

SH-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.^{45,46} Selain itu, miRNA-92a dan miRNA-146a memiliki sifat anti-inflamasi yang membantu mengurangi peradangan kulit kepala, yang sering dikaitkan dengan kerontokan rambut.^{47,48}

b. Protein dan Enzim

SH-MSC mengandung berbagai protein dan enzim yang mendukung regenerasi jaringan dan pertumbuhan sel. Protein seperti Wnt dan PDGF berperan dalam jalur sinyal yang penting untuk siklus pertumbuhan rambut.^{49,50} Wnt, misalnya, terlibat dalam aktivasi fase anagen folikel

rambut, sementara PDGF membantu dalam regulasi siklus rambut dan mencegah apoptosis sel dermal papilla.

c. Lipida

Komponen lipida dalam *SH-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.⁵¹

d. *Cytokine dan Growth factors*

SH-MSC mengandung berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan seperti PDGF, VEGF, dan IGF-1 yang berperan dalam angiogenesis, proliferasi sel, dan penyembuhan luka. PDGF dan VEGF khususnya membantu meningkatkan suplai darah ke folikel rambut, memberikan nutrisi dan oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan rambut. *Insulin-like Growth factor 1* membantu merangsang pertumbuhan dan proliferasi sel dermal papilla.^{52,53}

2.5.3. Peran SH-MSC pada IL-6

Sekretom yang dihasilkan oleh *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) yang dikultur dalam kondisi hipoksia memiliki kemampuan imunomodulasi yang signifikan dalam menekan inflamasi. Kondisi hipoksia meningkatkan ekspresi *Hypoxia-Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α), yang menjadi regulator

utama adaptasi seluler terhadap lingkungan rendah oksigen. Stabilisasi HIF-1 α dalam MSC memicu produksi berbagai molekul bioaktif dalam sekretom, termasuk sitokin, secretome, dan faktor pertumbuhan, yang berkontribusi pada pengurangan faktor inflamasi, termasuk IL-6.

Salah satu mekanisme utama adalah peningkatan pelepasan Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) oleh MSC. IDO mengkatalisis degradasi triptofan menjadi metabolit seperti kynurenin, yang menekan aktivasi sel T pro-inflamasi dan mendorong diferensiasi sel T regulatorik (Treg). Selain itu, sekretom MSC yang dipengaruhi hipoksia juga kaya akan Prostaglandin E2 (PGE2), molekul lipid yang menghambat proliferasi sel T pro-inflamasi (Th1 dan Th17) sekaligus mendorong peralihan makrofag ke fenotipe anti-inflamasi (M2).

Sekretom hipoksia juga mengandung Transforming *Growth factor*- β (TGF- β) dan Interleukin-10 (IL-10), dua sitokin anti-inflamasi utama yang bekerja menekan respons imun berlebihan. Molekul-molekul ini mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 oleh makrofag dan sel imun lainnya. Selain itu, sekretom hipoksia MSC menginduksi pelepasan Heme Oxygenase-1 (HO-1) dan Vascular Endothelial *Growth factor* (VEGF), yang membantu memperbaiki jaringan melalui angiogenesis dan efek sitoprotektif pada sel endotel.

Peningkatan secretome dalam sekretom hipoksia juga berperan penting. Secretome ini membawa microRNA (miRNA) anti-inflamasi seperti miR-146a dan miR-21, yang menghambat jalur pro-inflamasi seperti NF- κ B dan MAPK. Dengan kombinasi molekul ini, sekretom MSC yang

dihasilkan dalam kondisi hipoksia tidak hanya menekan inflamasi, tetapi juga mendukung regenerasi jaringan yang rusak, menjadikannya terapi potensial untuk penyakit inflamasi kronis dan akut.

2.5.4. Peran SH-MSC terhadap Kadar IL-10

Sekretom mesenchymal stem cell merupakan kumpulan molekul bioaktif yang disekresikan oleh sel punca mesenkimal selama proses fisiologis dan dalam kondisi tertentu, termasuk hipoksia.^{54,55} Komponen utama dari sekretom ini meliputi sitokin, *growth factors*, kemokin, mikroRNA, dan vesikel ekstraseluler seperti eksosom, yang semuanya memainkan peran penting dalam modulasi respons imun dan regenerasi jaringan. Salah satu efek imunomodulator paling menonjol dari sekretom MSC adalah kemampuannya dalam meningkatkan sekresi IL-10, sebuah sitokin antiinflamasi yang berfungsi meredam reaksi peradangan berlebihan. Mekanisme ini terjadi melalui interaksi kompleks antara faktor-faktor parakrin yang dilepaskan MSC dengan sel target seperti makrofag, sel T regulator, dan sel dendritik.^{56,57} Faktor-faktor seperti TGF- β , PGE2, IDO, dan HGF dalam sekretom telah terbukti berperan dalam induksi ekspresi IL-10 baik secara langsung maupun tidak langsung.^{56,57}

Peningkatan IL-10 yang dimediasi oleh sekretom MSC memiliki korelasi yang kuat dengan penurunan kadar sitokin proinflamasi seperti IL-6, TNF- α , dan IFN- γ . Sekretom MSC telah terbukti mampu mereprogram makrofag tipe M1 (proinflamasi) menjadi M2 (antiinflamasi), sebuah perubahan fenotip yang menghasilkan lebih banyak IL-10.⁵³ Hal ini menghasilkan kaskad, di mana peningkatan IL-10 menekan aktivasi jalur

inflamasi seperti NF- κ B dan STAT3, mengurangi infiltrasi sel inflamasi ke jaringan, serta menurunkan ekspresi gen-gen proinflamasi. Studi-studi in vivo pada model penyakit inflamasi seperti kolitis, cedera paru akut, dan *Alopecia-like* pada tikus juga menunjukkan bahwa pemberian sekretom MSC terutama dalam bentuk gel topikal atau injeksi local dapat meningkatkan ekspresi gen IL-10 dan secara signifikan menurunkan tanda-tanda inflamasi lokal maupun sistemik.^{56,57}

2.6. Model Penelitian Menggunakan Induksi Fluconazole

Fluconazole merupakan agen antijamur golongan azol yang bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim lanosterol 14 α -demethylase, bagian dari keluarga enzim sitokrom P450 (CYP450). Meski sasaran utamanya adalah mengganggu pembentukan ergosterol pada membran sel jamur, fluconazole juga dapat memengaruhi kinerja enzim CYP450 pada sel mamalia, sehingga berpotensi mengubah jalur metabolisme berbagai senyawa biologis penting, termasuk hormon steroid.⁵⁸

Salah satu akibat dari terhambatnya aktivitas CYP450 adalah terganggunya proses konversi kolesterol menjadi hormon steroid, salah satunya estrogen. Estrogen memiliki peran penting dalam mempertahankan siklus pertumbuhan rambut, terutama dalam menjaga fase anagen (fase aktif pertumbuhan) dan menunda peralihan ke fase katagen (fase kemunduran). Penurunan kadar estrogen karena gangguan metabolisme ini dapat memicu ketidakseimbangan siklus rambut yang berujung pada kerontokan.^{58,59}

Selain memengaruhi metabolisme hormon, hambatan jalur sterol juga dapat berdampak pada kestabilan struktur membran sel manusia, meski sel manusia sendiri tidak memproduksi ergosterol. Gangguan ini dapat melemahkan integritas membran lipid, menyebabkan ketidakseimbangan osmotik, serta meningkatkan kepekaan sel terhadap rangsangan pro-apoptotik, termasuk pada sel folikel rambut. Kondisi tersebut menjadikan sel folikel lebih rentan mengalami apoptosis. Ketika folikel rambut mati, pertumbuhan rambut akan terhenti dan folikel akan beralih ke fase dorman (telogen) yang ditandai dengan kerontokan difus. Jalur ini memperlihatkan kaitan antara paparan fluconazole, penurunan aktivitas CYP450, gangguan produksi hormon, hingga munculnya alopecia.^{58,59}

Di sisi lain, fluconazole juga memengaruhi fungsi mitokondria dengan menghambat kompleks I dan III pada rantai transpor elektron. Hambatan tersebut menurunkan efisiensi fosforilasi oksidatif, mengurangi produksi ATP, sekaligus meningkatkan kebocoran elektron yang memicu akumulasi Reactive Oxygen Species (ROS) berlebih.^{60,61} Peningkatan ROS memicu stres oksidatif yang merusak struktur lipid, protein, dan DNA sel. Pada jaringan kulit kepala, sel-sel dengan ketergantungan tinggi pada energi mitokondria — seperti sel endotel kapiler dan sel folikel rambut — sangat rentan terhadap kerusakan akibat ROS. Penumpukan ROS yang tidak terkendali akan memperburuk disfungsi mitokondria dan memicu apoptosis melalui jalur intrinsik.⁶¹

Dampak awal stres oksidatif berat ini tampak pada apoptosis sel endotel, khususnya di pembuluh darah mikro di dermis yang mendukung

folikel rambut.^{62,63} Kerusakan sel endotel menurunkan pasokan oksigen dan nutrisi, menimbulkan kondisi hipoksia lokal yang semakin membebani folikel rambut. Hipoksia kronis menjadi salah satu pemicu utama aktivasi jalur apoptosis di dalam sel folikel. Dalam situasi hipoksia, ekspresi HIF-1 α meningkat, memicu program kematian sel karena lingkungan mikro yang tidak lagi mendukung kelangsungan hidup folikel.^{64,65} Akibatnya, siklus pertumbuhan rambut terhenti dan bergeser ke fase rontok (telogen), menghasilkan manifestasi klinis berupa alopecia yang dipicu jalur mitokondria-hipoksia.^{64,65}

Fluconazole juga berkontribusi pada terjadinya kerontokan rambut melalui beberapa jalur patofisiologis lain, seperti disfungsi vaskular, peningkatan apoptosis, dan aktivasi respon imun.^{64,65} Obat ini dapat meningkatkan ROS yang bersifat toksik bagi sel endotel di area dermal papilla, memicu apoptosis terus-menerus, mengganggu aliran darah, serta mempercepat degenerasi sel dermal papilla yang berujung pada kerontokan rambut. Sel yang mengalami apoptosis akan melepaskan DAMP (damage-associated molecular patterns) yang memicu aktivasi jalur transkripsi NF- κ B, sehingga merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IFN- γ . Kedua mediator ini mendorong polarisasi makrofag ke tipe 1 (proinflamasi) yang memperparah peradangan akibat paparan fluconazole.⁴⁰

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Fluconazole merupakan agen antijamur golongan azol yang bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim lanosterol 14 α -demethylase, bagian dari keluarga enzim sitokrom P450 (CYP450). Meski sasaran utamanya adalah mengganggu pembentukan ergosterol pada membran sel jamur, fluconazole juga dapat memengaruhi kinerja enzim CYP450 pada sel mamalia, sehingga berpotensi mengubah jalur metabolisme berbagai senyawa biologis penting, termasuk hormon steroid.⁶⁶

Salah satu akibat dari terhambatnya aktivitas CYP450 adalah terganggunya proses konversi kolesterol menjadi hormon steroid, salah satunya estrogen. Estrogen memiliki peran penting dalam mempertahankan siklus pertumbuhan rambut, terutama dalam menjaga fase anagen (fase aktif pertumbuhan) dan menunda peralihan ke fase katagen (fase kemunduran). Penurunan kadar estrogen karena gangguan metabolisme ini dapat memicu ketidakseimbangan siklus rambut yang berujung pada kerontokan.⁶⁶

Selain memengaruhi metabolisme hormon, hambatan jalur sterol juga dapat berdampak pada kestabilan struktur membran sel manusia, meski sel manusia sendiri tidak memproduksi ergosterol. Gangguan ini dapat melemahkan integritas membran lipid, menyebabkan ketidakseimbangan osmotik, serta meningkatkan kepekaan sel terhadap rangsangan pro-apoptotik, termasuk pada sel folikel rambut.

Kondisi tersebut menjadikan sel folikel lebih rentan mengalami apoptosis. Ketika folikel rambut mati, pertumbuhan rambut akan terhenti dan folikel akan beralih ke fase dorman (telogen) yang ditandai dengan kerontokan difus. Jalur ini memperlihatkan kaitan antara paparan fluconazole, penurunan aktivitas CYP450, gangguan produksi hormon, hingga munculnya alopecia.

Di sisi lain, fluconazole juga memengaruhi fungsi mitokondria dengan menghambat kompleks I dan III pada rantai transpor elektron. Hambatan tersebut menurunkan efisiensi fosforilasi oksidatif, mengurangi produksi ATP, sekaligus meningkatkan kebocoran elektron yang memicu akumulasi Reactive Oxygen Species (ROS) berlebih.^{2,40}

Peningkatan ROS memicu stres oksidatif yang merusak struktur lipid, protein, dan DNA sel. Pada jaringan kulit kepala, sel-sel dengan ketergantungan tinggi pada energi mitokondria — seperti sel endotel kapiler dan sel folikel rambut — sangat rentan terhadap kerusakan akibat ROS. Penumpukan ROS yang tidak terkendali akan memperburuk disfungsi mitokondria dan memicu apoptosis melalui jalur intrinsik.

Dampak awal stres oksidatif berat ini tampak pada apoptosis sel endotel, khususnya di pembuluh darah mikro di dermis yang mendukung folikel rambut. Kerusakan sel endotel menurunkan pasokan oksigen dan nutrisi, menimbulkan kondisi hipoksia lokal yang semakin membebani folikel rambut.

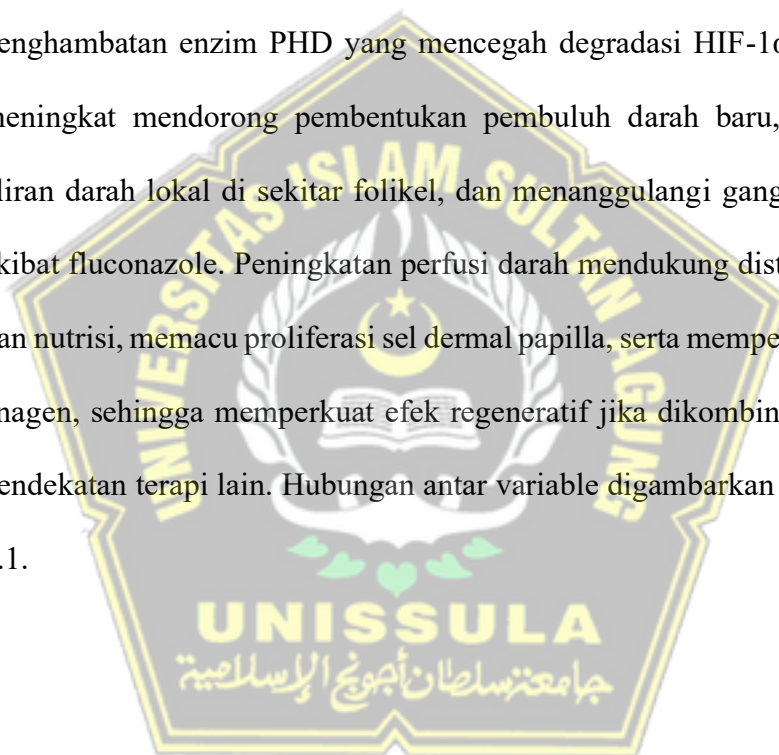
Hipoksia kronis menjadi salah satu pemicu utama aktivasi jalur apoptosis di dalam sel folikel. Dalam situasi hipoksia, ekspresi HIF-1 α meningkat, memicu program kematian sel karena lingkungan mikro yang tidak lagi mendukung kelangsungan hidup folikel. Akibatnya, siklus pertumbuhan rambut terhenti dan bergeser ke fase rontok (telogen), menghasilkan manifestasi klinis berupa alopecia yang dipicu jalur mitokondria-hipoksia.

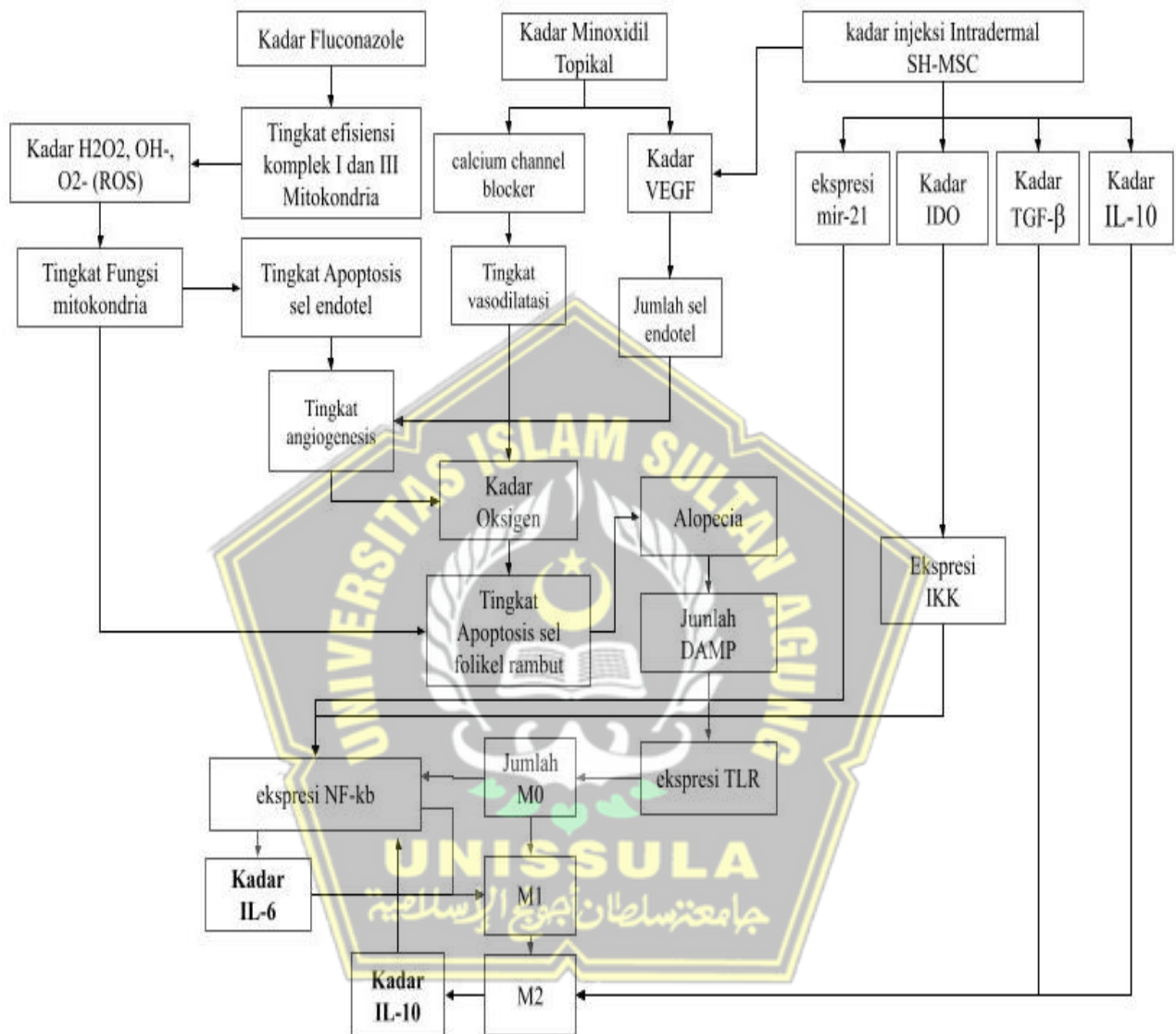
Fluconazole juga berkontribusi pada terjadinya kerontokan rambut melalui beberapa jalur patofisiologis lain, seperti disfungsi vaskular, peningkatan apoptosis, dan aktivasi respon imun.^{2,40} Obat ini dapat meningkatkan ROS yang bersifat toksik bagi sel endotel di area dermal papilla, memicu apoptosis terus-menerus, mengganggu aliran darah, serta mempercepat degenerasi sel dermal papilla yang berujung pada kerontokan rambut. Sel yang mengalami apoptosis akan melepaskan DAMP (damage-associated molecular patterns) yang memicu aktivasi jalur transkripsi NF- κ B, sehingga merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IFN- γ . Kedua mediator ini mendorong polarisasi makrofag ke tipe 1 (proinflamasi) yang memperparah peradangan akibat paparan fluconazole.

Pemberian secretome hypoxia-derived MSCs (SH-MSCs) berpotensi meredam respon inflamasi ini. Secretome mengandung molekul bioaktif seperti IL-10, miR-21, dan TGF- β yang berfungsi menekan jalur IKK1NF- κ B, sehingga aktivitas NF- κ B berkurang dan produksi TNF- α serta IFN- γ menurun. Di samping itu, TGF- β mendukung peralihan makrofag dari

fenotipe tipe 1 (proinflamasi) ke tipe 2 (antiinflamasi), yang semakin menekan pelepasan mediator inflamasi.

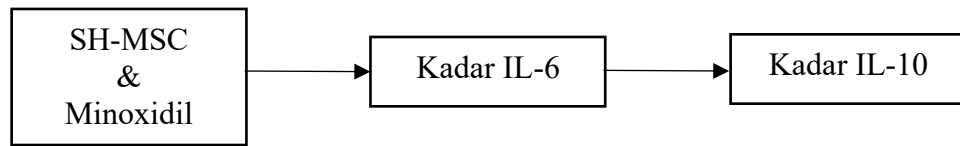
Sementara itu, minoxidil memiliki mekanisme kerja yang berbeda dalam mendukung regenerasi folikel rambut. Senyawa ini merangsang produksi VEGF (*Vascular Endothelial Growth factor*), faktor kunci pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis). Minoxidil diduga meningkatkan ekspresi VEGF dengan cara menstabilkan HIF-1 α , melalui penghambatan enzim PHD yang mencegah degradasi HIF-1 α . VEGF yang meningkat mendorong pembentukan pembuluh darah baru, memperbaiki aliran darah lokal di sekitar folikel, dan menanggulangi gangguan vaskular akibat fluconazole. Peningkatan perfusi darah mendukung distribusi oksigen dan nutrisi, memacu proliferasi sel dermal papilla, serta mempertahankan fase anagen, sehingga memperkuat efek regeneratif jika dikombinasikan dengan pendekatan terapi lain. Hubungan antar variable digambarkan dalam gambar 3.1.





Gambar 3. 1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka konsep



Gambar 3. 2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh kombinasi injeksi intradermal SH-MSC dosis 100 uL dan minoxidil topical dosis 5% terhadap kadar IL-6 dan IL-10 pada Tikus model *Alopecia-like* yang diinduksi Fluconazole.

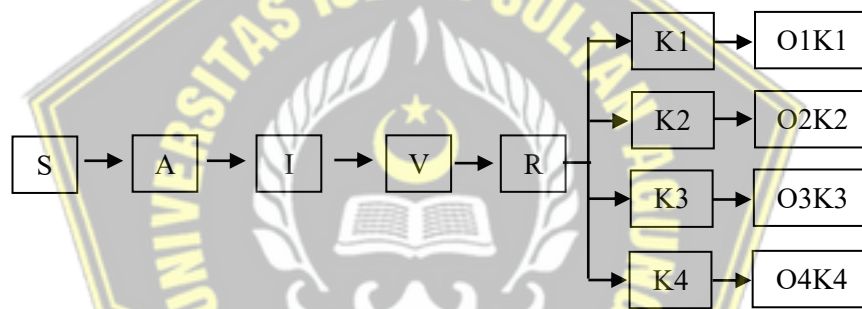


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S = Sampel

A = Aklimatisasi hewan coba

R = Random Alokasi hewan coba

I = Induksi Fluconazole

V = Validasi

K1 = Tikus induksi Fluconazole model *Alopecia-like* pemberian injeksi NaCl 0,9%

K2 = Tikus induksi Fluconazole model *Alopecia-like* pemberian Minoxidil 5% secara topikal

K3 = Tikus induksi Fluconazole model *Alopecia-like* pemberian injeksi SH-MSCs 100 uL

K4 = Tikus induksi Fluconazole model *Alopecia-like* pemberian injeksi SH-MSCs 100 uL + Minoxidil 5%

O1K1 = Observasi kadar IL-6 dan IL-10 kelompok K1

O2K2 = Observasi kadar IL-6 dan IL-10 kelompok K2

O3K3 = Observasi kadar IL-6 dan IL-10 kelompok K3

O4K4 = Observasi kadar IL-6 dan IL-10 kelompok K4

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel penelitian

- a. Variabel Bebas penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Secretome hypoxia* MSC dan Minoxidil
- b. Variabel Perantara penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar IL-6
- c. Variabel Tergantung penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar IL-10

- c. Variabel Prakondisi penelitian ini adalah pemberian Fluconazole secara oral.

4.2.2 Definisi Operasional

a. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell

Secretome hipoksia Mesenchymal Stem Cell adalah kumpulan faktor bioaktif yang dihasilkan oleh MSC setelah inkubasi dalam kondisi hipoksia selama 24 jam, kemudian difiltrasi menggunakan teknik *tangential flow filtration* (TFF) dengan filter ukuran 10-100 kDa untuk memisahkan molekul target. Injeksi SH-MSC dilakukan secara intradermal dengan dosis 100 uL.⁶⁸

Skala: Ordinal

b. Kadar IL-6

IL-6 adalah sitokin pro-inflamasi yang diukur dari sampel jaringan kulit yang diambil pada hari ke-14 pasca perlakuan. Konsentrasi IL-6 dianalisis menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk menentukan kadar spesifiknya dalam jaringan kulit.

Skala: Rasio

Satuan : pg/mL

c. Kadar IL-10

Interleukin 10 adalah protein yang berperan dalam regulasi pertumbuhan sel dan regenerasi jaringan. IL-10 diukur jaringan kulit yang diambil pada hari ke-14 pasca perlakuan kemudian dianalisis menggunakan metode ELISA untuk menentukan konsentrasinya pada jaringan kulit.

Skala: Rasio

Satuan : pg/mL

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek penelitian

Tikus jantan galur Wistar berusia 6-8 minggu dengan berat badan 200-250 gram digunakan sebagai subjek penelitian ini setelah dinyatakan sehat dan layak oleh dokter hewan dari Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Indonesia. Hewan percobaan ini dipelihara dalam kondisi laboratorium yang memenuhi standar, dengan ventilasi udara yang memadai dan suhu ruangan terjaga pada kisaran 20-28°C. Selama masa pemeliharaan, tikus makanan standar berupa pakan pelet komersial serta air minum bersih diberikan *ad libitum* untuk memastikan kebutuhan nutrisinya tercukupi dan kondisi fisiknya tetap optimal.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria inklusi

- a. Tikus galur Wistar
- b. Jenis kelamin jantan
- c. Usia 6-8 minggu
- d. Berat badan 200-250 g
- e. Mengalami *Alopecia-like*
- f. Tidak memiliki kelainan anatomis
- g. Tikus bergerak secara aktif.

4.3.2.2. Kriteria eksklusi

- a. 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. Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan besaran sampel dihitung

menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, penelitian menggunakan 6 ekor sampel per perlakuan. Untuk menghadapi risiko mortalitas pada tikus, setiap kelompok ditambah sampel sebanyak satu ekor dari jumlah hitungan menjadi total 7 ekor per perlakuan. Dengan demikian, jumlah total sampel yang digunakan adalah 28 ekor.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat Penelitian

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

4.5.2. 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 *Secretome* 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 IL-6 (Elabscience No Cat: E-EL-R0015) dan IL-10 (Elabscience No Cat: E-EL-R0016).

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. *Ethical clearance*

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

4.6.2. Sumber SH-MS

Produk SH-MS yang digunakan di penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR, Semarang, Indonesia). Sediaan SH-MS berupa larutan steril yang siap diinjeksikan ke objek percobaan.

4.6.3. Pembuatan Tikus Model Alopecia dan Pemberian Perlakuan

Pembuatan tikus model alopecia menggunakan protokol dari penelitian sebelumnya, yaitu sebagai berikut :⁶⁹

- a. Setelah satu minggu adaptasi, tikus diberikan kombinasi xylazine (20 mg/kgbb) dan ketamine (60 mg/kgbb) untuk menginduksi anestesi.
- b. Mencukur rambut pada punggung tikus
- c. Tikus kelompok K1 tidak di berikan treatment apapun. Tikus kelompok K2 sd K4 diberikan fluconazole 35 mg/kgBB per oral selama 14 hari menggunakan sonde yaitu pada hari ke 7-21

- d. Hari ke-21, dilakukan validasi
- e. Setelah dilakukan validasi, perlakuan berupa Minoxidil 5% secara topikal (K2), injeksi SH-MSCs 100 uL intradermal di area dorsal (K3) dan SH-MSCs 100 uL intradermal dan Minoxidil 5% di area dorsal (K4) diberikan pada hari ke 22-28.
- f. Hari ke-29 tikus diterminasi dengan cara dislokasi servikal dan diambil jaringan untuk keperluan analisis ELISA dan analisis HE untuk validasi alopecia *post treatment*.

4.6.4. Metode Validasi Hewan Coba

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 berikut⁶⁹:

- 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 hematoksin, 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.

4.6.5. Terminasi dan Koleksi Jaringan Kulit

Protokol terminasi dan koleksi jaringan mengacu pada penelitian terdahulu, yaitu⁷⁰

- a) Tikus diterminasi menggunakan dislokasi servikal.
- b) Setelah tikus diterminasi, bersihkan area kulit bagian dorsal dan didesinfeksi menggunakan povidone iodine.
- c) Ambil sampel jaringan dengan metode biopsi punch untuk mendapatkan.
- d) Masukkan sampel ke dalam tabung yang telah berisi PBS dan *snap freeze* menggunakan nitrogen cair
- e) Simpan sampel pada kondisi -80°C

4.6.6. Preparasi jaringan dan Analisis ELISA

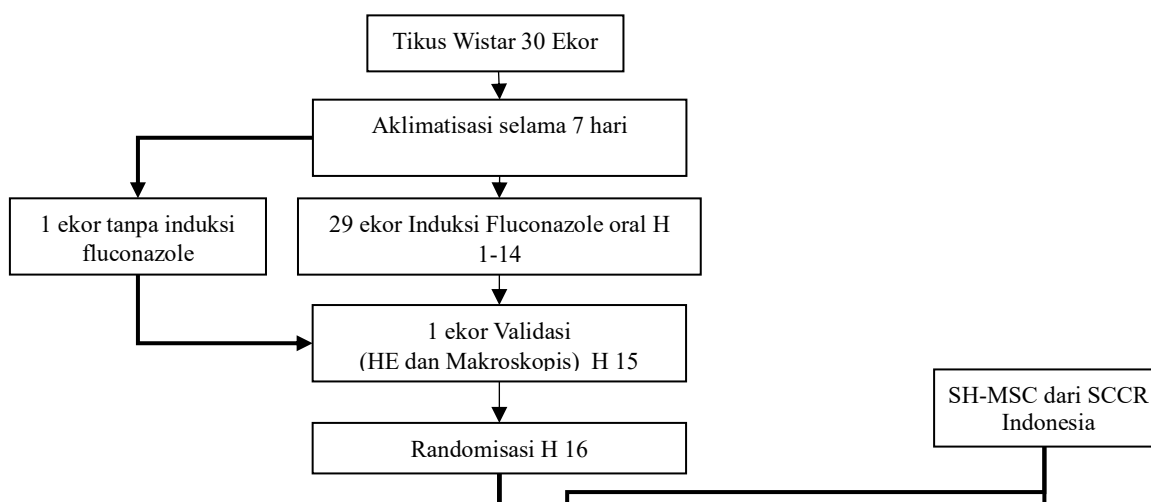
Protokol preparasi jaringan dan analisis elisa mengacu para petunjuk analisis pada kit ELISA yang digunakan, meliputi ⁷⁰:

- a) Bilas jaringan dengan PBS dingin untuk menghilangkan kontaminan.
- b) Potong jaringan dalam ukuran kecil dan timbang sebesar 50 mg
- c) Homogenisasi jaringan dalam larutan RIPA buffer
- d) Centrifuge pada 4°C, 12.000 rpm, 10–15 menit dan ambil supernatannya.
- e) Tentukan sumuran untuk standar, blanko, dan sampel yang akan dianalisis
- f) Tambahkan sebanyak 100 µL larutan standar, blanko, dan sampel ke sumur yang telah ditentukan
- g) Tutup pelat sumuran menggunakan plastik penutup hingga rapat untuk mencegah terjadinya penguapan reagen, kemudian inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C
- h) Buang cairan dari setiap sumur, tanpa pembilasan. Segera tambahkan 100 µL larutan Antibodi Deteksi Biotinilasi ke setiap sumur
- i) Tutupi pelat dengan penutup baru dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C
- j) Lakukan pencucian dengan menambahkan 350 µL larutan *wash buffer* ke setiap sumur, diulangi sebanyak 3 kali
- k) Tambahkan 100 µL Konjugat HRP ke setiap sumur
- l) Tutupi pelat dengan penutup baru, inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C

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



4.7. Alur Penelitian





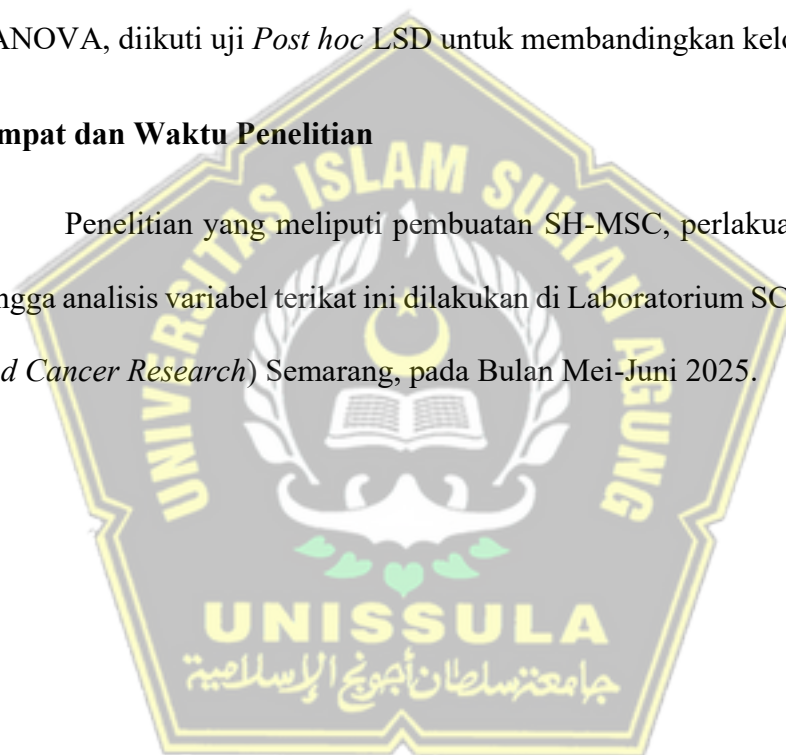
Gambar 4. 2. Alur Penelitian

4.8. Analisa Data

Data dianalisis menggunakan software SPSS. Uji deskriptif diterapkan untuk mengukur kadar IL-6 dan IL-10 pada tikus Wistar. Data yang digunakan berjenis skala rasio. Uji Shapiro-Wilk dan Levene digunakan untuk menganalisis normalitas dan homogenitas data. Data normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji beda menggunakan uji One-Way ANOVA, diikuti uji *Post hoc* LSD untuk membandingkan kelompok.

4.9. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang meliputi pembuatan SH-MSC, perlakuan hewan coba hingga analisis variabel terikat ini dilakukan di Laboratorium SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*) Semarang, pada Bulan Mei-Juni 2025.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

Alopecia merupakan kondisi hilangnya rambut yang dapat disebabkan oleh berbagai faktor, termasuk gangguan autoimun, inflamasi kronis, stres oksidatif, maupun disfungsi folikel rambut. Terapi terkini menggunakan minoxidil tidak mampu menghentikan sumber utama penyebab alopecia. Berdasarkan masalah tersebut, perlu adanya penelitian untuk mengkaji terapi lain yang mampu mengatasi peradangan yang menjadi sumber utama alopecia, oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk bertujuan mengevaluasi efek pemberian SH-MSC, baik secara tunggal maupun dikombinasikan dengan minoxidil topikal, terhadap kadar IL-6 dan IL10 pada tikus model *Alopecia-like*.

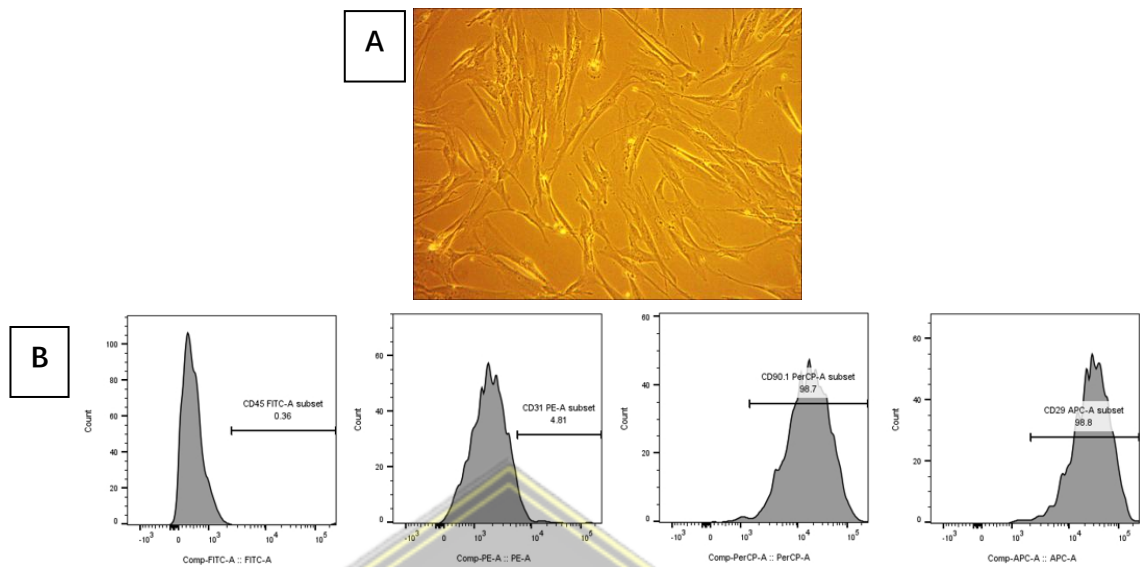
Penelitian Model *Alopecia-like* menggunakan 28 tikus Jantan galur Wistar yang diinduksi dengan pemberian fluconazole oral selama 14 hari untuk memicu kerontokan rambut melalui mekanisme disfungsi folikel. Setelah induksi dan tikus tervalidasi mengalami *Alopecia-like* baik secara makroskopis dan mikroskopis, tikus dibagi menjadi empat kelompok perlakuan: kelompok 1 (K1) yang menerima injeksi NaCl, kelompok 2 (K2) yang mendapatkan aplikasi minoxidil topikal, kelompok 3 (K3) yang menerima injeksi sekretom hipoksia MSC, serta kelompok 4 (K4) yang mendapatkan kombinasi injeksi sekretom hipoksia MSC dan aplikasi minoxidil 5% topical. Injeksi sekretom diberikan satu kali setelah periode

induksi, diikuti observasi selama 7 hari. Pada hari ke-7 pascaperlakuan, tidak ada tikus yang masuk kriteria *drop out* dan kemudian diterminasi dan jaringan kulit diambil untuk analisis. Selama penelitian tidak ada tikus yang *drop out*. Kadar IL-6 dan IL-10 dari jaringan kulit bagian dorsal diukur menggunakan metode ELISA dengan satuan pg/mL dan dianalisis ELISA

5.1.1. Hasil Validasi *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*

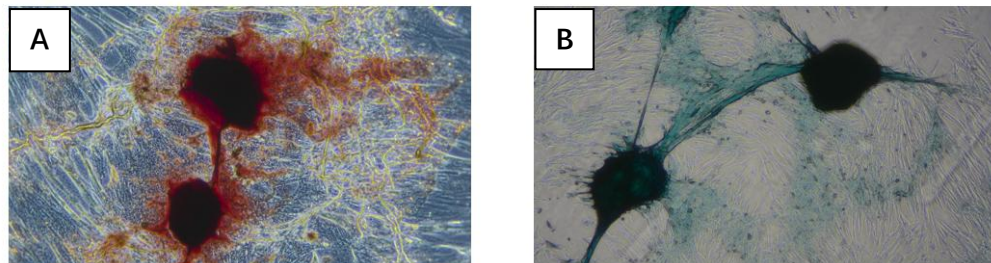
Mesenchymal stem cell didapatkan dari Laboratorium SCCR Indonesia di Semarang, menggunakan sumber berupa tali pusat tikus pada usia berusia 21 hari kehamilan. Setelah proses isolasi, sel-sel tersebut dikultur dalam *Flask* kultur yang berisi media DMEM. Setelah mencapai pasase kelima, analisis morfologi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

Analisis identitas sel menggunakan *surface marker* MSC menggunakan metode *flow cytometry* menunjukkan bahwa sel yang dikultur secara kuat mengekspresikan CD90 (98,7%) dan CD29 (98,8%), dan hanya sedikit mengekspresikan CD45 (0,36%) dan CD31 (4,81%) (Gambar 5.1B). Hal ini menunjukkan bahwa sel yang dikultur dari tali pusat memiliki karakteristik MSC.



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

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



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

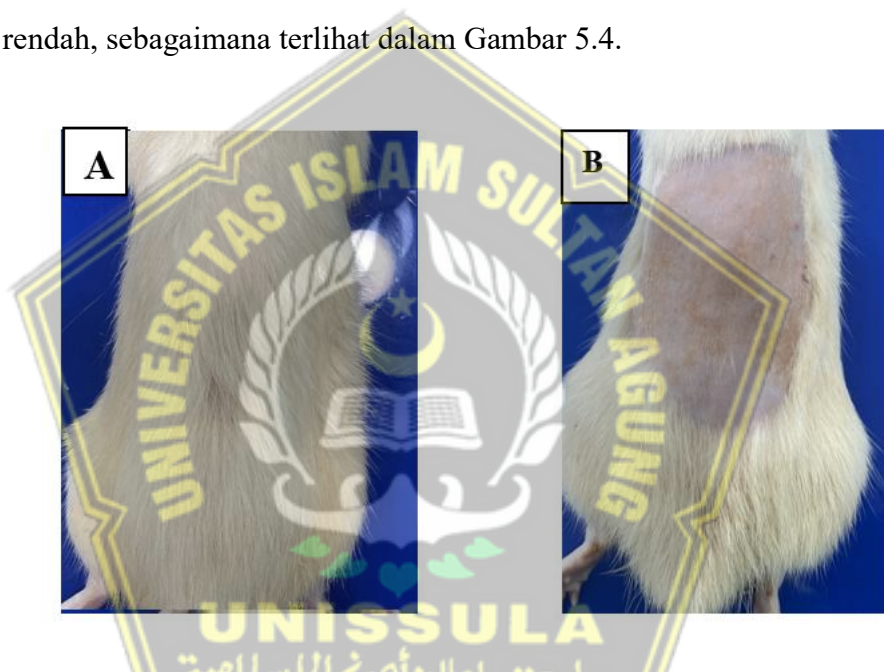
Setelah MSC tervalidasi, media kultur MSC dikumpulkan dan disterilkan menggunakan filter 0,1 um dan dilanjutkan dengan proses diultrafiltrasi menggunakan metode TFF pada ukuran membran 100-500 kda. Kadar protein pada sekretom dianalisis menggunakan metode ELISA dan didapatkan data sebagaimana terlihat pada Tabel 5.1. Berdasarkan hasil analisa, didapatkan bahwa kadar SH-MSC yang dihasilkan memenuhi standar kualitas.

Tabel 5. 1. Kadar Protein pada SH-MSC

Parameter	Hasil	Standar	Metode Uji
Kadar VEGF	303,04 pg/mL	>100 pg/mL	ELISA
Kadar IFN- γ	9,73 pg/mL	≤ 50 pg/mL	ELISA
Kadar IL-10	100,29 pg/mL	>100 pg/mL	ELISA

5.1.2. Hasil Validasi *Alopecia-like*

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

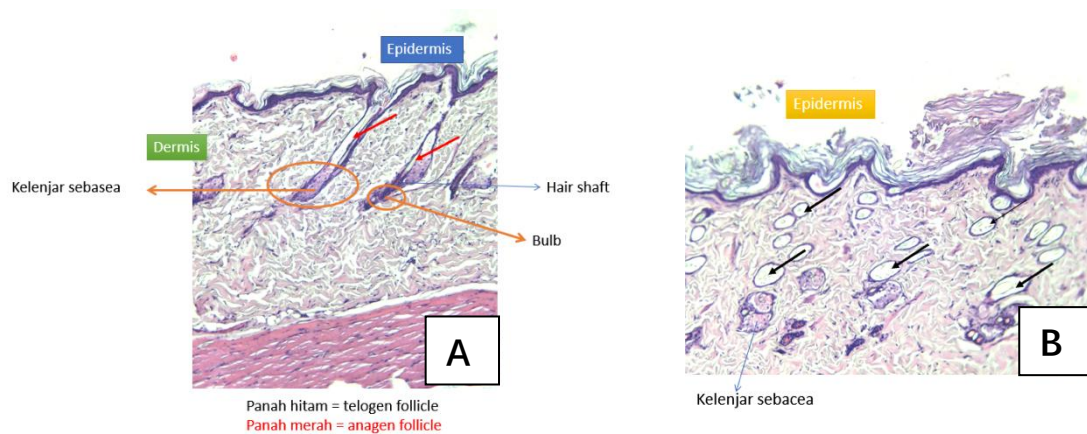


Gambar 5.3. Validasi Makroskopis *Alopecia-like* Tikus sehat (A) memiliki kondisi densitas rambut yang lebih tinggi, sedangkan tikus yang dipapar fluconazole memiliki densitas rambut yang lebih rendah (B)

Selain secara visual makroskopis, validasi juga dilakukan dengan melakukan pengecatan HE pada jaringan kulit. Hasil menunjukkan bahwa tikus sehat yang tidak diinduksi *Alopecia-like* menggunakan fluconazole nampak bahwa Lapisan epidermis tampak utuh, terdiri dari lapisan stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, dan stratum korneum yang

kompak. Dermis papiler dan retikuler tersusun baik dengan serabut kolagen teratur dan distribusi fibroblas yang normal. Tidak ditemukan infiltrasi sel radang. Folikel rambut berada pada fase anagen yang dominan, dengan batang rambut utuh dan matriks aktif di bagian *bulb*. Selubung akar bagian luar dan dalam (*outer dan inner root sheath*) terlihat lengkap tanpa tanda degenerasi. Tidak ada miniaturisasi folikel atau transisi prematur ke fase telogen. Tampak lapisan jaringan ikat longgar dan sedikit jaringan adiposa subkutan yang teratur.

Sisi lain, jaringan kulit tikus yang diinduksi *Alopecia-like* dengan flucozole menunjukkan lapisan epidermis relatif utuh, namun tampak sedikit hiperkeratosis pada stratum korneum. Folikel rambut mayoritas berada pada fase telogen, ditandai posisi folikel yang lebih superfisial, *bulb* kecil, dan tidak adanya matriks aktif pembentuk batang rambut. Folikel anagen sangat berkurang; yang ada menunjukkan ukuran lebih kecil dibandingkan kulit sehat dan beberapa mengalami miniaturisasi. Beberapa folikel telogen tampak kosong (tanpa batang rambut), konsisten dengan proses hair shedding pada AA. Hasil validasi pengecatan HE terlihat pada Gambar 5.5.



Gambar 5. 4. Validasi Mikroskopis *Alopecia-like* Tikus sehat (A) memiliki kondisi folikel rambut dominan pada fase Anagen sedangkan tikus yang dipapar fluconazole (B) memiliki kondisi folikel rambut dominan pada fase Telogen (Perbesaran 100x)

5.1.4 Kadar IL-6

Pengukuran kadar IL-6 dilakukan dengan metode ELISA dari jaringan kulit tikus model alopecia pada hari ke-7 pasca pemberian perlakuan pertama. Hasil pengukuran disajikan dalam satuan pg/mL dan menunjukkan perbedaan rerata antar kelompok yang cukup jelas seperti yang ditampilkan pada tabel 5.3.

Tabel 5. 2. Data Hasil Analisis Kadar IL-6 pada berbagai macam kelompok perlakuan dengan menggunakan ELISA jaringan kulit

Variabel	Kelompok				P
	K1 (pg/mL)	K2 (pg/mL)	K3 (pg/mL)	K4 (pg/mL)	
Kadar IL-6	4,81±0,41	3,82±0,26	2,98±0,18	1,62±0,38	
Shapiro Wilk	0,25	0,18	0,56	0,63	
Lavene test					0,28
One Way Anova					<0,00

Kelompok kontrol negatif (K1), yaitu tikus alopecia yang diberikan injeksi NaCl, menunjukkan kadar IL-6 tertinggi sebesar $4,81 \pm 0,41$ pg/mL. Kelompok kontrol positif (K2), yang menerima perlakuan topikal minoxidil, memiliki kadar IL-10 sebesar $3,82 \pm 0,26$ pg/mL.

Sementara itu, kadar IL-6 pada kelompok perlakuan K3, yakni tikus alopecia yang diberikan injeksi SH-MSC, lebih rendah yaitu $2,98 \pm 0,18$ pg/mL. Nilai terendah diperoleh pada kelompok K4, yang mendapatkan kombinasi injeksi SH-MSC dan minoxidil topikal, yaitu sebesar $1,62 \pm 0,38$ pg/mL.

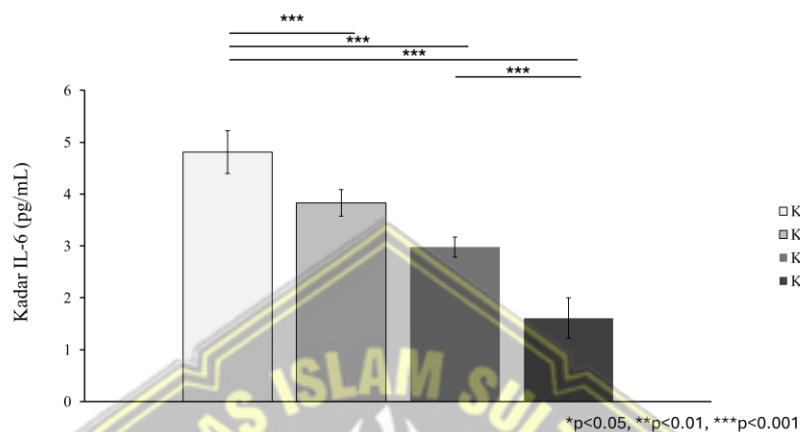
Uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$). Analisis ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$), yang mengindikasikan bahwa masing-masing perlakuan memberikan pengaruh yang bermakna terhadap penurunan kadar IL-6 pada jaringan kulit tikus model alopecia.

Tabel 5. 3. Perbedaan rerata kadar IL-6 antar dua kelompok dengan Uji *Post hoc* LSD pada berbagai macam kelompok perlakuan dengan menggunakan ELISA jaringan kulit

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	<0,001
	K3	<0,001
	K4	<0,001
K2	K3	<0,001
	K4	<0,001
K3	K2	<0,001

Berdasarkan data kadar IL-6 yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji *post hoc* LSD, karena data bersifat normal dan homogen. Data hasil uji *post hoc* LSD tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.2. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K3 dan K4 berbeda signifikan dibanding dengan seluruh ($p < 0,05$) dibandingkan dengan K1 dan

K2, dan K3 juga berbeda signifikan dibanding dengan K4 ($<0,05$). Data juga menunjukkan K4 memiliki kadar IL-6 lebih tinggi dibandingkan K3 seperti yang terlihat pada Gambar 5.6.



Gambar 5. 5. Grafik Kadar IL-6 pada berbagai macam kelompok perlakuan dengan menggunakan ELISA jaringan kulit

5.1.3. Kadar IL-10

Pengukuran kadar IL-10 dilakukan menggunakan metode ELISA dari jaringan kulit tikus model alopecia pada hari ke-7 setelah perlakuan pertama. Hasil rerata kadar IL-10 (dalam satuan pg/mL) menunjukkan adanya perbedaan yang jelas antar kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif (K1), yaitu tikus alopecia yang hanya diberikan injeksi NaCl, menunjukkan kadar IL-10 terendah sebesar $0,31 \pm 0,13$ pg/mL. Kelompok kontrol positif (K2), yang mendapatkan perlakuan topikal minoxidil, mengalami peningkatan kadar IL-10 menjadi $1,54 \pm 0,26$ pg/mL.

Tabel 5.4. Data Hasil Analisis Kadar IL-10 pada berbagai macam kelompok perlakuan dengan menggunakan ELISA jaringan kulit

Variabel	Kelompok				P
	K1 (pg/mL)	K2 (pg/mL)	K3 (pg/mL)	K4 (pg/mL)	
Kadar IL-10	0,31±0,13	1,54±0,26	2,83±0,30	4,20±0,16	
Shapiro Wilk	0,27	0,33	0,75	0,50	
Lavene test					0,46
One Way Anova					<0,00

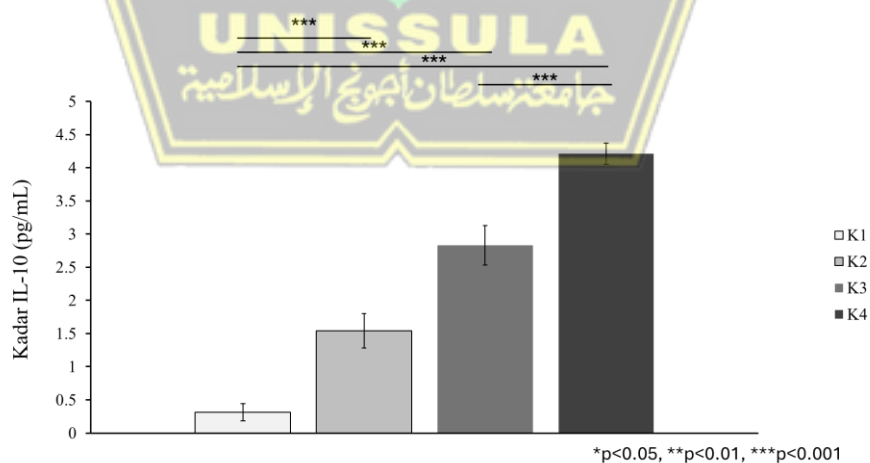
Peningkatan yang lebih tinggi teramati pada kelompok perlakuan K3, yaitu tikus yang diberikan injeksi sekretom MSC hipoksia, dengan kadar IL-10 sebesar $2,83 \pm 0,30$ pg/mL. Sementara itu, kadar IL-10 tertinggi tercatat pada kelompok K4 yang menerima kombinasi injeksi sekretom MSC dan aplikasi topikal minoxidil, yakni sebesar $4,20 \pm 0,16$ pg/mL.

Uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$). Hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$), yang mengindikasikan bahwa pemberian sekretom MSC hipoksia, baik sendiri maupun dalam kombinasi dengan minoxidil, berpengaruh nyata dalam meningkatkan kadar IL-10 pada jaringan kulit tikus alopecia. Hasil uji beda yang signifikan, dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD dan ditemukan hasil seperti yang ditampilkan dalam tabel 5.2

Tabel 5. 5. Perbedaan rerata kadar IL-10 antar dua kelompok dengan Uji *Post hoc* LSD

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	<0,001
	K3	<0,001
	K4	<0,001
K2	K3	<0,001
	K4	<0,001
K3	K2	<0,001

Berdasarkan data kadar IL-10 yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji *post hoc* LSD, karena data bersifat normal dan homogen. Data hasil uji *post hoc* LSD tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.2. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K3 dan K4 berbeda signifikan dibanding dengan seluruh ($p < 0,05$) dibandingkan dengan K1 dan K2, dan K3 juga berbeda signifikan dibanding dengan K4 ($< 0,05$). Data juga menunjukkan K4 memiliki kadar IL-10 lebih tinggi dibandingkan K3 seperti yang terlihat pada Gambar 5.6.



Gambar 5. 6. Grafik Kadar IL-10 pada berbagai macam kelompok perlakuan dengan menggunakan ELISA jaringan kulit

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Alopecia adalah gangguan multifaktorial yang melibatkan berbagai elemen imunologis, inflamasi, dan stres oksidatif yang berkontribusi terhadap disfungsi folikel rambut.⁷¹⁻⁷³ Terapi standar seperti minoxidil yang digunakan tidak dapat menyelesaikan gangguan multi faktorial tersebut sehingga menyebabkan sering terjadinya *relapse* sehingga membutuhkan inovasi terapi yang dapat menyelesaikan masalah tersebut.^{3,4,9,34,74} Terapi yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemberian SH-MSC dan minoxidil, baik secara tunggal maupun kombinasi, untuk memodulasi kadar sitokin utama seperti IL-10 dan IL-6 pada jaringan kulit tikus model alopecia.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok yang menerima kombinasi sekretom dan minoxidil (K4) memiliki kadar IL-6 terendah dan IL-10 tertinggi, dibandingkan dengan kelompok K1 maupun pemberian pemberian SH-MSC secara tunggal (K3). Perubahan signifikan pada kedua sitokin ini mencerminkan efek sinergis antara SH-MSC dan minoxidil sebagai imunomodulator dan antiinflamasi dari perlakuan yang diberikan, yang berkontribusi pada lingkungan mikro yang mendukung regenerasi rambut.

Menurut penelitian lain, IL-6 merupakan salah satu mediator utama inflamasi dalam berbagai kondisi degeneratif, termasuk alopecia.²⁸ IL-6 dihasilkan oleh sel keratinosit, makrofag M1, dan fibroblas sebagai respons terhadap kerusakan jaringan atau infeksi.^{26,27} IL-6 juga berkontribusi terhadap kerusakan folikel rambut dengan menekan aktivitas sel punca folikel (HFSC), memicu transisi dini ke fase katagen, dan menginduksi apoptosis sel-sel penunjang folikel pada kasus alopecia.^{26,27}

Protein pleiotropik ini bekerja melalui aktivasi reseptornya (IL-6R α), yang berasosiasi dengan gK330, dan memicu jalur JAK/STAT3 proinflamasi. Aktivasi STAT3 akibat aktivasi IL-6 ini mendorong ekspresi gen proinflamasi dan pro-apoptotik seperti Bax, serta menurunkan ekspresi jalur regeneratif seperti Wnt/ β -catenin. Jalur ini sangat penting, karena Wnt/ β -catenin berperan dalam mengaktifkan kembali sel punca folikel selama fase anagen. Oleh karena itu, peningkatan IL-6 secara langsung menghambat regenerasi rambut dan mempercepat degenerasi folikel.^{26,27}

Data penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (K-) memiliki kadar IL-6 tertinggi, mengindikasikan inflamasi aktif dan kerusakan jaringan. Sebaliknya, kelompok K4 menunjukkan kadar IL-6 terendah, mencerminkan efek antiinflamasi kuat dari kombinasi sekretom dan minoxidil. Sekretom hipoksia MSC diketahui mengandung berbagai faktor yang secara langsung menghambat ekspresi IL-6, seperti IL-10 dan TGF- β , melalui penghambatan aktivitas NF- κ B, sebuah faktor transkripsi sentral dalam regulasi ekspresi gen inflamasi.^{75,76}

Penurunan IL-6 pada kombinasi injeksi SH-MSC dan minoxidil dapat dikaitkan dengan peran minoxidil dalam meningkatkan produksi VEGF. Minoxidil diketahui dapat meningkatkan ekspresi VEGF-A pada folikel rambut, yang merangsang angiogenesis dan memperkuat kapasitas antioksidan melalui enzim seperti HO-1, Prdx, dan glutathione reductase. Selain itu, VEGF-B yang dapat dirangsang oleh minoxidil, juga berperan sebagai antioksidan kuat dengan menginduksi Gpx1 dan enzim terkait.

Peningkatan aktivitas antioksidan ini menurunkan stres oksidatif, yang secara fisiologis dapat menekan produksi IL-6 pro-inflamasi, sehingga mendukung lingkungan folikel yang lebih sehat untuk pertumbuhan rambut. Hal ini yang menyebabkan K4 memiliki kadar IL-6 terendah.^{77,78} Penurunan IL-6 yang signifikan pada kelompok K3 dan K4 dalam penelitian ini juga diperkuat oleh data kadar IL-10 yang menunjukkan adanya peningkatan pasca pemberian injeksi SH-MSC secara tunggal atau pun yang dikombinasikan dengan minoxidil.

Protein IL-10 adalah sitokin antiinflamasi kunci yang diproduksi oleh berbagai jenis sel, termasuk sel T regulator (Treg), makrofag tipe M2, dan MSC sendiri.^{30,79,80} IL-10 berperan sebagai penyeimbang dalam sistem imun, dengan menghambat produksi sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1 β , TNF- α , serta mengurangi aktivasi makrofag M1 dan sel dendritik.^{30,79,80}

Mekanisme molekuler IL-10 dimediasi oleh aktivasi reseptor IL-10R α dan IL-10R β , yang merekrut dan mengaktifkan JAK1/TYK2, diikuti oleh fosforilasi STAT3. STAT3 yang teraktivasi akan berpindah ke nukleus dan menginduksi ekspresi gen protein antiinflamasi yang berperan dalam menghambat sinyal inflamasi lanjutan dari IL-6 dan TNF- α .^{30,79,80} Selain itu, IL-10 juga mendorong polarisasi makrofag ke arah fenotipe M2, yang memiliki sifat reparatif, angiogenik, dan mendukung pemanjangan fase anagen pada siklus rambut.^{81,82} Hal ini menyebabkan IL-10 memiliki kemampuan dalam menekan respons inflamasi berlebihan, sehingga mencegah kerusakan sel-sel penunjang pertumbuhan rambut.⁸³

Penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok K4 yang menerima kombinasi sekretom MSC hipoksia dan minoxidil menunjukkan peningkatan IL-10 yang signifikan dibandingkan kelompok lain. Hal ini dapat dijelaskan melalui kontribusi masing-masing perlakuan terhadap peningkatan ekspresi IL-10. Sekretom MSC hipoksia mengandung berbagai molekul bioaktif seperti TGF- β , PGE2, dan IL-10, yang menginduksi ekspresi antiinflamasi termasuk IL-10.^{75,76}

perubahan kadar IL-6 dan IL-10 juga mencerminkan pergeseran polaritas makrofag dari fenotipe M1 (proinflamasi) ke M2 (reparatif). Sekretom MSC, terutama dalam kondisi hipoksia, diketahui sebagai penginduksi kuat makrofag M2, yang menghasilkan IL-10, arginase-1, dan TGF- β . Pergeseran ini mempercepat resolusi peradangan, meningkatkan remodeling jaringan, dan mendukung neovaskularisasi di sekitar folikel rambut. Dengan perbaikan suplai darah dan penurunan stres oksidatif, siklus rambut dapat kembali ke fase anagen dengan lebih stabil.^{75,76}

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi sekretom MSC hipoksia dan minoxidil bekerja melalui dua jalur utama yaitu melalui penurunan IL-6 melalui penghambatan jalur NF- κ B dan STAT3 proinflamasi yang menghambat kerusakan jaringan. Efek sinergis ini membentuk dasar molekuler yang kuat untuk pendekatan kombinatorial sebagai terapi regeneratif pada alopecia, yang tidak hanya menargetkan pertumbuhan rambut tetapi juga memperbaiki mikro-lingkungan folikel secara menyeluruh

dan peningkatan IL-10 melalui aktivasi STAT3 protektif dan HIF-1 α yang menciptakan lingkungan antiinflamasi dan mendukung regenerasi.^{75,76}

Penelitian ini belum mengeksplorasi secara detail potensi interaksi obat, khususnya pada penggunaan *minoxidil* topikal yang diberikan bersamaan dengan injeksi SH-MSC. Aspek ini penting untuk diperhatikan karena prosedur penyuntikan berpotensi memengaruhi penyerapan sistemik *minoxidil* ke dalam aliran darah, yang pada gilirannya dapat berdampak terhadap profil keamanan maupun efektivitas terapi. Selain itu, penelitian ini juga tidak melibatkan kelompok sehat sebagai kontrol, sehingga perbedaan respons antara individu dengan alopecia dan individu dengan kondisi fisiologis normal belum dapat dijelaskan secara menyeluruh.

Dengan demikian, penelitian di masa mendatang disarankan untuk menambahkan analisis farmakokinetik guna menilai kemungkinan penyerapan sistemik *minoxidil* ketika dikombinasikan dengan SH-MSC, sehingga mekanisme kerja serta aspek keamanannya dapat lebih dipahami. Penelitian selanjutnya juga diharapkan melibatkan kelompok sehat sebagai pembanding agar efek terapi dapat dievaluasi secara lebih komprehensif antara subjek normal dan subjek dengan alopecia.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi SH-MSC dan Minoxidil topikal terhadap kadar IL-10 dan IL-6 pada tikus jantan galur Wistar model *Alopecia-like* membuktikan hal-hal berikut:

- a. terdapat pengaruh injeksi intradermal SH-MSC 100 μ L dan minoxidil 5% topikal terhadap kadar IL-6 pada tikus jantan galur Wistar model *alopecia like*.
- b. terdapat pengaruh injeksi intradermal SH-MSC 100 μ L dan minoxidil 5% topikal terhadap kadar IL-10 pada tikus jantan galur Wistar model *alopecia like*.

6.2. Saran

- a. Studi yang akan datang diharapkan untuk mengukur kadar, ekspresi protein intraseluler seperti setelah dilakukan injeksi SH-MSC pada berbagai dosis yang berbeda pada tikus model *Alopecia-like*.
- b. Melakukan uji klinis fase 1 pada manusia yang bertujuan untuk mengevaluasi keamanan, tolerabilitas, dosis, serta efek farmakokinetik dan farmakodinamik dari SH-MSC.
- c. Penelitian lanjutan perlu menguji interaksi obat antara SH-MSC dan Minoxidil.
- d. Penelitian lanjutan untuk menguji pengaruh berbagai macam dosis SH-MSC yang bisa digunakan dan dosis maksimalnya

DAFTAR PUSTAKA

1. Waśkiel-Burnat A, Osińska M, Salińska A, Blicharz L, Goldust M, Olszewska M, et al. The role of serum th1, th2, and th17 cytokines in patients with alopecia areata: Clinical implications. Vol. 10, Cells. 2021.
2. Hati IP. Effect of Topical Gel Administration of Secretome *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) on IL-10 and TNF- α Gene Expression (In Vivo Experimental Study in Male Rats of Wistar Strains Model of Fluconazole-Induced Alopecia). Int J Multidiscip Res Anal. 2023;06(12).
3. Modha JD, Pathania YS. Comprehensive review of oral minoxidil in alopecia. Vol. 21, Journal of Cosmetic Dermatology. 2022. p. 5527–31.
4. Martora F, Vastarella M, Fattore D, Patri A, Fabbrocini G, Cantelli M. Oral Minoxidil for Chemotherapy-Induced Alopecia. Ski Appendage Disord. 2022;8(6):508–10.
5. Gupta AK, Talukder M, Shemar A, Piraccini BM, Tosti A. Low-Dose Oral Minoxidil for Alopecia: A Comprehensive Review. Vol. 9, Skin Appendage Disorders. 2023. p. 423–37.
6. Shimizu Y, Ntege EH, Sunami H, Inoue Y. Regenerative medicine strategies for hair growth and regeneration: A narrative review of literature. Vol. 21, Regenerative Therapy. 2022. p. 527–39.
7. Anudeep TC, Jeyaraman M, Muthu S, Rajendran RL, Gangadaran P, Mishra PC, et al. Advancing Regenerative Cellular Therapies in Non-Scarring Alopecia. Vol. 14, Pharmaceutics. 2022.
8. Ou KL, Kuo YW, Wu CY, Huang BH, Pai FT, Chou HH, et al. The potential of a hair follicle mesenchymal stem cell-conditioned medium for wound healing and hair follicle regeneration. Appl Sci. 2020;10(8).
9. Suchonwanit P, Thammarucha S, Leerunyakul K. Minoxidil and its use in hair disorders: A review. Vol. 13, Drug Design, Development and Therapy. 2019. p. 2777–86.
10. Nestor MS, Ablon G, Gade A, Han H, Fischer DL. Treatment options for androgenetic alopecia: Efficacy, side effects, compliance, financial considerations, and ethics. Vol. 20, Journal of Cosmetic Dermatology. 2021. p. 3759–81.
11. Sibbald C. Alopecia Areata: An Updated Review for 2023. Vol. 27, Journal of Cutaneous Medicine and Surgery. 2023. p. 241–59.
12. Nadimi S. Complications with Hair Transplantation. Vol. 28, Facial Plastic Surgery Clinics of North America. 2020. p. 225–35.
13. Li Y, Wang G, Wang Q, Zhang Y, Cui L, Huang X. Exosomes Secreted from Adipose-Derived Stem Cells Are a Potential Treatment Agent for Immune-

Mediated Alopecia. J Immunol Res. 2022;2022.

14. Prie BE, Voiculescu VM, Ionescu-Bozdog OB, Petrutescu B, Iosif L, Gaman LE, et al. Oxidative stress and alopecia areata. Vol. 8 Spec, Journal of medicine and life. 2015. p. 43–6.
15. Pratt CH, King LE, Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. Alopecia areata. Vol. 3, Nature Reviews Disease Primers. 2017.
16. Rose-John S. Interleukin-6 family cytokines. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;
17. Rose-John S. Interleukin-6 signalling in health and disease. F1000Research. 2020;
18. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. Vol. 50, Immunity. 2019. p. 1007–23.
19. Metcalfe RD, Putoczki TL, Griffin MDW. Structural Understanding of Interleukin 6 Family Cytokine Signaling and Targeted Therapies: Focus on Interleukin 11. Frontiers in Immunology. 2020.
20. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. Vol. 26, Cytokine and Growth factor Reviews. 2015. p. 475–87.
21. Dhall A, Patiyal S, Sharma N, Usmani SS, Raghava GPS. Computer-aided prediction and design of IL-6 inducing peptides: IL-6 plays a crucial role in COVID-19. Brief Bioinform. 2021;22(2):936–45.
22. Rose-John S, Jenkins BJ, Garbers C, Moll JM, Scheller J. Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects. Vol. 23, Nature Reviews Immunology. 2023. p. 666–81.
23. Ille AM, Lamont H, Mathews MB. The Central Dogma revisited: Insights from protein synthesis, CRISPR, and beyond. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2022;13(5).
24. Naik SP, Mahesh PA, Jayaraj BS, Madhunapantula SR V., Jahromi SR, Yadav MK. Evaluation of inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in asthma. J Asthma. 2017;
25. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. Vol. 33, International immunology. 2021. p. 127–48.
26. Tomaszewska K, Kozłowska M, Kaszuba A, Lesiak A, Narbutt J, Zalewska-Janowska A. Increased Serum Levels of IFN- γ , IL-1 β , and IL-6 in Patients with Alopecia Areata and Nonsegmental Vitiligo. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020.
27. Smith SEP, Maus RLG, Davis TR, Sundberg JP, Gil D, Schrum AG. Maternal IL-6 can cause T-cell-mediated juvenile alopecia by non-scarring follicular dystrophy in mice. Exp Dermatol. 2016;25(3):223–8.

28. Aşkın Ö, Yücesoy SN, Coşkun E, Engin B, Serdaroğlu S. Evaluation of the level of serum Interleukins (IL-2, IL-4, IL-15 and IL-17) and its relationship with disease severity in patients with alopecia areata. *An Bras Dermatol*. 2021;96(5):551–7.
29. Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Vol. 19, *Annual Review of Immunology*. 2001. p. 683–765.
30. Deng JC, Standiford TJ. Interleukin-10. In: *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, Second Edition. 2021. p. 295–302.
31. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth factor Rev*. 2010;21(5):331–44.
32. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020;217(1).
33. Freyschmidt-Paul P, McElwee KJ, Happle R, Kissling S, Wenzel E, Sundberg JP, et al. Interleukin-10-deficient mice are less susceptible to the induction of alopecia areata [3]. Vol. 119, *Journal of Investigative Dermatology*. 2002. p. 980–2.
34. Gupta AK, Talukder M, Venkataraman M, Bamimore MA. Minoxidil: a comprehensive review. Vol. 33, *Journal of Dermatological Treatment*. 2022. p. 1896–906.
35. Ghonemy S, Alarawi A, Bessar H. Efficacy and safety of a new 10% topical minoxidil versus 5% topical minoxidil and placebo in the treatment of male androgenetic alopecia: a trichoscopic evaluation. *J Dermatolog Treat*. 2021;32(2):236–41.
36. Zito PM, Hin N. Minoxidil Use in Alopecia. *J Dermatol Nurses Assoc*. 2017;9(5):264–7.
37. Godse K, De A, Vedamurthy M, Shankar DSK, Shah B, Girdhar M, et al. Low-dose Oral Minoxidil in the Treatment of Alopecia: Evidence and Experience-based Consensus Statement of Indian Experts. Vol. 15, *International Journal of Trichology*. 2023. p. 91–7.
38. Yum S, Jeong S, Kim D, Lee S, Kim W, Yoo JW, et al. Minoxidil induction of VEGF is mediated by inhibition of HIF-prolyl hydroxylase. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1).
39. Rahmanita MA, Putra A, Hermansyah D. The Effect of Topical Gel Secretome Hypoxic *Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) on IL-6 and TGF- β Gene Expression (Experimental Study in Male Wistar *Alopecia-like* Rat Models Induced by Fluconazole). *Int J Multidiscip Res Anal*. 2023;06(12).
40. Thompson GR, Krois CR, Affolter VK, Everett AD, Katarina Varjonen E, Sharon VR, et al. Examination of fluconazole-induced alopecia in an animal

model and human cohort. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(2).

41. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*. 2020.
42. An T, Chen Y, Tu Y, Lin P. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: Application and Challenges. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2021.
43. Novello S, Pellen-Mussi P, Jeanne S. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles as cell-free therapy: Perspectives in periodontal regeneration. *J Periodontal Res* [Internet]. 2021 Jun;56(3):433–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jre.12866>
44. Casado-Díaz A, Quesada-Gómez JM, Dorado G. Extracellular Vesicles Derived From *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8(March):1–19.
45. 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).
46. Zhang X, Bao P, Zheng Q, Chu M, Liang C, Guo X, et al. Comparative Analysis of mRNA and miRNA Expression between Dermal Papilla Cells and Hair Matrix Cells of Hair Follicles in Yak. *Cells*. 2022;11(24).
47. Winkler I, Engler JB, Vieira V, Bauer S, Liu YH, Di Liberto G, et al. MicroRNA-92a-CPEB3 axis protects neurons against inflammatory neurodegeneration. *Sci Adv*. 2023;9(47).
48. Liao Z, Zheng R, Shao G. Mechanisms and application strategies of miRNA-146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review). Vol. 51, *International Journal of Molecular Medicine*. 2023.
49. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol*. 2010;190(6):1079–91.
50. Choi JS, Yoon HI, Lee KS, Choi YC, Yang SH, Kim IS, et al. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release*. 2016;
51. Ruvolo PP, Jacamo R, Ruvolo VR, Burks JK, Battula VL, McQueen T, et al. Exosomes Mediate Communication Between the Microenvironment and Leukemic Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2012;120(21):3469–3469.
52. 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).
53. Kang K, Ma R, Cai W, Huang W, Paul C, Liang J, et al. Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing *Mesenchymal Stem Cells* Promote Cardioprotection via Akt Signaling Pathway following Myocardial Infarction. *Stem Cells Int.* 2015;2015.
 54. Damayanti RH, Rusdiana T, Wathoni N. Mesenchymal stem cell secretome for dermatology application: A review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology.* 2021.
 55. Trzyna A, Banaś-Ząbczyk A. Adipose-derived stem cells secretome and its potential application in “stem cell-free therapy.” Vol. 11, *Biomolecules.* 2021.
 56. Pianta S, Bonassi Signoroni P, Muradore I, Rodrigues MF, Rossi D, Silini A, et al. Amniotic Membrane Mesenchymal Cells-Derived Factors Skew T Cell Polarization Toward Treg and Downregulate Th1 and Th17 Cells Subsets. *Stem Cell Rev Reports.* 2015;11(3):394–407.
 57. Ti D, Yi J, Chen H, Hao H, Shi C. The Role of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Secretome in Macrophage Polarization: Perspectives on Treating Inflammatory Diseases. Vol. 19, *Current Stem Cell Research and Therapy.* 2024. p. 894–905.
 58. AL-Shafeiy HM, Ibrahim BMM, Safar MM, El-Shenawy SMA, Yassin NAZ, Kenawy SA. Fluconazole, a fungal cytochrome P450 enzyme inhibitor: The potential role in augmenting hepatotoxicity and hyperinsulinemia induced by dexamethasone in rats. *Egypt J Chem.* 2019;62(10):1895–906.
 59. N.J. G, U.P. K, T.S. P. Adverse reactions to antifungal agents. *Adverse Drug Reaction Bulletin.* 2008.
 60. Haegler P, Joerin L, Krähenbühl S, Bouitbir J. Hepatocellular toxicity of imidazole and triazole antimycotic agents. *Toxicol Sci.* 2017;157(1):183–95.
 61. Dbouk NH, Covington MB, Nguyen K, Chandrasekaran S. Increase of reactive oxygen species contributes to growth inhibition by fluconazole in *Cryptococcus neoformans*. *BMC Microbiol.* 2019;19(1).
 62. Liang CH, Lin YH, Lin YK, Chiang CF. Hair growth-promotion effects and antioxidant activity of the banana flower extract HappyAngel®: double-blind, placebo-controlled trial. *Food Sci Hum Wellness.* 2023;12(5):1917–23.
 63. Lee S, Ohn J, Kang BM, Hwang ST, Kwon O. Activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 promotes hair growth in human hair follicles. *J Adv Res.* 2024;64:237–47.

64. Sagawa N, Oshima Y, Hiratsuka T, Kono Y, Etoh T, Inomata M. Role of increased vascular permeability in chemotherapy-induced alopecia: In vivo imaging of the hair follicular microenvironment in mice. *Cancer Sci.* 2020;111(6):2146–55.
65. Bassino E, Antoniotti S, Gasparri F, Munaron L. Effects of flavonoid derivatives on human microvascular endothelial cells. *Nat Prod Res.* 2016;30(24):2831–4.
66. Benitez LL, Carver PL. Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. Vol. 79, *Drugs*. 2019. p. 833–53.
67. 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.
68. Ni J, Ye D, Zeng W, Ma S, Wang Z, Kuang Y, et al. Promotion of hair growth by a conditioned medium from human umbilical cord *Mesenchymal Stem Cells* cultivated in a 3D scaffold of gelatin sponge. *Eur J Med Res.* 2024 May;29(1):270.
69. Hati IP. Pengaruh Pemberian Gel Topikal Secretome *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (Sh-Mscs) Terhadap Ekspresi Gen IL-10 DAN TNF- α . Universitas Islam Sultan Agung; 2023.
70. Arindani NDP. Pengaruh Pemberian Krim Ekstrak Kacang Kedelai Terhadap Kadar Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) dan Interleukin-6 (IL-6) (Studi Eksperimental in Vivo Pada Mencit Balb/c yang diinduksi sinar UVB). Unissula; 2023.
71. Ma YQ, Sun Z, Li YM, Xu H. Oxidative stress and alopecia areata. Vol. 10, *Frontiers in Medicine*. 2023.
72. Otlewska A, Otlewska A, Szpotowicz G. Alopecia areata. *Pediatr i Med Rodz.* 2019;15(4):358–61.
73. Olayinka J (Jadé) T, Richmond JM. Immunopathogenesis of alopecia areata. Vol. 2, *Current Research in Immunology*. 2021. p. 7–11.
74. Shen Y, Zhu Y, Zhang L, Sun J, Xie B, Zhang H, et al. New Target for Minoxidil in the Treatment of Androgenetic Alopecia. *Drug Des Devel Ther.* 2023;17:2537–47.
75. Wikanta ET, Subchan P, Putra A. The Effect of Secretome *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) Cream on IL-6 Gene Expression (In Vivo Study on Psoriasis-like Rats Model Induced by SH-MSCs). *Int J Multidiscip Res Anal.* 2023;06(03).
76. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kB signaling in inflammation. *Signal*

Transduct Target Ther. 2017;2(1):1–9.

77. Arjunan P, Lin X, Tang Z, Du Y, Kumar A, Liu L, et al. VEGF-B is a potent antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(41):10351–6.
78. Chen R, Lee C, Lin X, Zhao C, Li X. Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications. Vol. 143, *Pharmacological Research*. 2019. p. 33–9.
79. Kwilas AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. Vol. 96, *Neuropharmacology*. 2015. p. 55–69.
80. Barabási B, Barna L, Santa-Maria AR, Harazin A, Molnár R, Kincses A, et al. Role of interleukin-6 and interleukin-10 in morphological and functional changes of the blood–brain barrier in hypertriglyceridemia. *Fluids Barriers CNS*. 2023;20(1).
81. Makita N, Hizukuri Y, Yamashiro K, Murakawa M, Hayashi Y. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int Immunol*. 2015;27(3):131–41.
82. Rajendran RL, Gangadaran P, Seo CH, Kwack MH, Oh JM, Lee HW, et al. Macrophage-Derived Extracellular Vesicle Promotes Hair Growth. *Cells*. 2020;9(4).
83. Vanderford DA, Greer PK, Sharp JM, Chichlowski M, Clayburn Rouse D, Angelica Selim M, et al. Alopecia in IL-10-deficient mouse pups is c-kit-dependent and can be triggered by iron deficiency. *Exp Dermatol*. 2010;19(6):518–26.

