

**PENGARUH *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS* (EH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI
SOCS3 DAN STAT3**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6 model *Alopecia
Androgenic* yang diinduksi *Dihydrotestosterone*)**

TESIS

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



Magister Ilmu Biomedik

Pinandhito Nararya Wirrya Latukolan

MBK.24.23.010460

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

TESIS

PENGARUH *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (EH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI SOCS3 DAN STAT3 (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6 model *Alopecia Androgenic* yang diinduksi *Dihydrotestosterone*)

disusun oleh

Pinandhito Nararya Wirrya Latukolan

MBK.24.23.010460

yang dipertahankan didepan Tim Penguji
pada tanggal 29 Agustus 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II


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


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

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



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

PERNYATAAN

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



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Pinandhito Nararya Wirrya
Latukolan
Tempat / tanggal lahir : Malang , 17 Maret 1991
Agama : Protestan
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Pertiwi Manokwari Irian Jaya : Lulus tahun 1997
2. SD Bobkri Gondolayu Yogyakarta : Lulus tahun 2003
3. SMPN 13 Jakarta : Lulus tahun 2006
4. SMA Kolese John de Britto Yogyakarta : Lulus tahun 2010
5. Sarjana Universitas Kristen Indonesia : Lulus tahun 2015
6. Profesi FK Universitas Kristen Indonesia: Lulus tahun 2017
7. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : 2023 - Sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Istri : Aninditya Wahyuningtyas
2. Nama Anak : Shalom Galan Latukolan

KATA PENGANTAR

Puji syukur terpanjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga Tesis dengan judul “**Pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) terhadap Ekspresi SOCS3 DAN STAT3 (Studi eksperimental *In Vivo* Pada Mencit c57BL/6 model *Alopecia Androgenic* yang diinduksi *Dihydrotestosterone*)**” ini dapat penulis selesaikan.

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

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

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. H. Gunarto, SH, MH
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak DR. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr.dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS.
4. Dr.dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS, atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing pertama.

5. Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp.A selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
6. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes selaku penguji I yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
7. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan , Sp. KK, Subsp. DKE, FINSADV selaku penguji II yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
8. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes. selaku penguji III yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
10. Segenap staf administrasi program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
11. Kedua orang tua dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doanya.
12. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

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

Semarang, 29 Agustus 2025
Penulis,

Pinandhito Nararya Wirrya Latukolan



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
ABSTRAK	xiv
I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan Umum.....	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Originalitas Penelitian.....	6
1.5. Manfaat Penelitian.....	8
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	8
1.5.2. Manfaat Praktis.....	8
II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Alopecia.....	9
2.1.1. Definisi.....	9
2.1.2. Alopecia Androgenic (AGA).....	9
2.2. SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3).....	12
2.2.1. Definisi.....	12
2.2.2. Peran SOCS3 pada Alopecia.....	13
2.3. STAT3 (Signal transducer and activator of transcription-3).....	13
2.3.1. Definisi.....	13
2.3.2. Peran STAT3 pada Alopecia	14
2.4. Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSC).....	14

2.4.1. Definisi.....	14
2.4.2. Kandungan Exosome MSC.....	15
2.4.3. Metode Isolasi Exosome MSC	16
2.4.4. Hipoksia.....	18
2.5. Efek Exosome hypoxia mesenchymal stem cells terhadap ekspresi SOCS3 dan pada STAT3 pada Alopecia.....	199
III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....	20
3.1. Kerangka Teori.....	20
3.2. Kerangka konsep	26
3.3. Hipotesis	26
IV METODE PENELITIAN.....	27
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	27
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	28
4.2.1. Variabel penelitian	28
4.2.2. Definisi Operasional.....	28
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	30
4.3.1. Subyek penelitian.....	30
4.3.2. Sampel Penelitian	30
4.4. Besar Sampel	31
4.5. Alat dan Bahan	32
4.5.1. Alat Penelitian.....	32
4.5.2. Bahan Penelitian	32
4.6. Cara Penelitian.....	32
4.6.1. Ethical Clearance	32
4.6.2. Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord	33
4.6.3. Proses Hipoksia.....	34
4.6.4. Pembuatan Exosome Hipoksia MSCs	34
4.6.5. Pembuatan Alopecia dan Pemberian Perlakuan Pada Subjek Percobaan.....	35
4.6.6. Metode Validasi.....	36
4.6.7. Terminasi dan Pengambilan Jaringan	38

4.6.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA	39
4.6.9. Pembacaan SOCS3/STAT3 dengan Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	40
4.7. Alur Penelitian	42
4.8. Analisa Data	43
4.9. Tempat dan Waktu Penelitian.....	44
V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
5.1. Hasil Penelitian	45
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	54
VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	61
6.1. Kesimpulan.....	611
6.2. Saran	611
DAFTAR PUSTAKA.....	622
LAMPIRAN	67

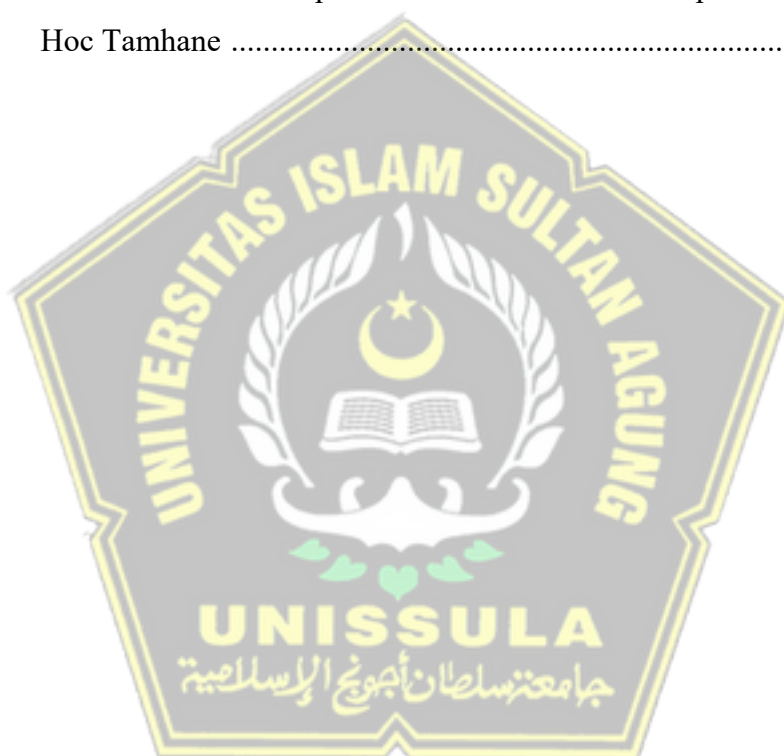


DAFTAR SINGKATAN

EH-MSC	: <i>Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
ADSC-Exos	: <i>Adipose-Derived Stem Cell Exosomes</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
SOCS3	: <i>Suppressor of cytokine signaling-3</i>
STAT3	: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
AGA	: <i>Alopecia Androgenic</i>
DHT	: <i>Dihydrotestosterone</i>
BMPs	: <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
GDFs	: <i>Growth Differentiation Factors</i>
IL-10	: <i>Interluekin-10</i>
MAPK/ERK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase / Extracellular-Signal-</i>
miRNA	: <i>Micro Ribonucleic Acid</i>
MiR-221	: <i>MicroRNA-221</i>
Treg	: <i>Regulatory T cells</i>
PEG	: <i>Polyethylene Glycol Regulated Kinase</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
RIPA	: <i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	6
Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Ekspresi SOCS3	50
Tabel 5.2. Perbedaan rerata Ekspresi SOCS3 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhene	51
Tabel 5.3. Data Hasil Analisis Ekspresi STAT3	52
Tabel 5.4. Perbedaan rerata Ekspresi STAT3 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Efek yang dimediasi androgen pada siklus pertumbuhan rambut yang menyebabkan AGA	10
Gambar 2.2. Mekanisme Kerja SOCS3	12
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	25
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	26
Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian	27
Gambar 4.2. Alur Penelitian.....	42
Gambar 5.1. Morfologi MSC.	45
Gambar 5.2. Kemampuan MSCs berdiferensiasi	47
Gambar 5.1. Hasil Analisis Kadar <i>Exosome</i> menggunakan marker CD63 dan CD9	47
Gambar 5.2. Validasi Alopesia Androgenik pada mencit	48
Gambar 5.5. Hasil mikroskopis pasca pemberian EH-MSCs	49
Gambar 5.8. Grafik Ekspresi SOCS3	52
Gambar 5.9. Grafik Ekspresi STAT3	54

ABSTRAK

Latar Belakang: Alopesia Androgenik adalah kondisi kerontokan rambut yang dapat berdampak signifikan pada kualitas hidup dan kesejahteraan psikologis. Penelitian menunjukkan bahwa *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) dan *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) memiliki peran penting dalam regulasi siklus pertumbuhan rambut. Eksosom dari sel punca mesenkim (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*, EH-MSCs) diketahui mengandung molekul bioaktif yang dapat mendukung regenerasi jaringan dan mengatur siklus rambut. Namun, studi mengenai pengaruh EH-MSCs terhadap ekspresi SOCS3 dan STAT3 pada model alopesia androgenik masih terbatas.

Metode: Studi eksperimental *in vivo* secara Randomized Post Test only Control Group Design. Penelitian ini menggunakan model mencit C57BL/6 yang diinduksi alopecia androgenic oleh dihidrotestosteron. Mencit dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, termasuk kelompok kontrol sehat, kontrol dihidrotestosteron, terapi minoxidil, serta dua dosis injeksi EH-MSCs (100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB). Analisis ekspresi SOCS3 dan STAT3 dilakukan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada sampel kulit mencit. ANOVA satu arah dengan pengujian hubungan antar kelompok, dilakukan uji Post Hoc Tamhene diterapkan dalam pemeriksaan statistik perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil: Dibandingkan dengan kelompok kontrol, analisis ekspresi SOCS3 pada K1 ($1,00 \pm 0,00$) dan pada K5 ($1,25 \pm 0,18$) adalah nilai tertinggi. Di sisi lain, ekspresi STAT3 pada K2 ($3,00 \pm 1,28$) tertinggi dan K5 dengan $0,89 \pm 0,15$ pg/mL mendekati K1 dengan $1,00 \pm 0,00$ pg/mL. Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis 200 µg/kgBB EH-MSC secara signifikan meningkatkan ekspresi SOCS3 dan menormalkan ekspresi STAT3 dengan menurunkan kadar yang meningkat abnormal pada alopesia androgenik.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) EH-MSC dosis 100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB terhadap peningkatan ekspresi SOCS3 dan penurunan ekspresi STAT3 menuju nilai normal pada mencit model alopesia androgenik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata Kunci: alopesia androgenik, *SOCS3*, *STAT3* dan *EH-MSCs*

ABSTRACT

Background: Androgenic Alopecia is a condition of hair loss that can have a significant impact on quality of life and psychological well-being. Research shows that *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) and *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) have an important role in the regulation of the hair growth cycle. Exosomes from mesenchymal stem cells (EH-MSCs) are known to contain bioactive molecules that can support tissue regeneration and regulate the hair cycle. However, studies on the effect of EH-MSCs on SOCS3 and STAT3 levels in androgenic alopecia models are still limited.

Methods: This was an in vivo experimental study using a Randomized Post-Test Only Control Group Design. This study used a model of C57BL/6 mice induced androgenic alopecia by dihydrotestosterone. The mice were divided into five treatment groups, including a healthy control group, a dihydrotestosterone control, minoxidil therapy, as well as two injectable doses of EH-MSCs (100 µg/kgBW and 200 µg/kgBW). Analysis of SOCS3 and STAT3 levels was carried out using the PCR (*Polymerase Chain Reaction*) method on mice skin samples. One-way ANOVA with testing relationships between groups, a Post Hoc Tamhene test was carried out in a statistical examination of differences between treatment groups.

Results: Compared to the control group, the analysis of SOCS3 expression showed in K1 (1.00 ± 0.00) and the highest values in K5 (1.25 ± 0.18). On the other hand, STAT3 expression was highest in K2 (3.00 ± 1.28), while K5 (0.89 ± 0.15 pg/mL) decreased to a level close to K1 (1.00 ± 0.00 pg/mL). Overall, these findings indicate that administration of EH-MSCs at a dose of 200 µg/kgBW significantly increased SOCS3 expression and normalized STAT3 expression by reducing its abnormal elevation in androgenetic alopecia.

Conclusions: The administration of Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs) at doses of 100 µg/kgBW and 200 µg/kgBW significantly increased SOCS3 expression and normalized STAT3 expression toward physiological levels in a mouse model of androgenetic alopecia compared with the control group.

Keywords: alopecia-androgenic, SOCS3, STAT3 and EH-MSCs

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alopesia adalah penyakit yang umum terjadi di seluruh dunia yang utamanya disebabkan oleh genetika, gangguan hormonal, peradangan imun, malnutrisi, faktor lingkungan, gangguan mental, penuaan, dan faktor-faktor lainnya.^{1,2} Alopesia androgenik (*Alopecia androgenic* , AGA) merupakan kelainan genetik berupa hilangnya rambut terminal yang tebal dan berpigmen secara progresif sebagai akibat dari sensitivitas terhadap hormon androgen.¹ AGA dapat terjadi pada pria maupun wanita, tetapi berdasarkan jenis kelamin, prevalensi AGA lebih sering ditemukan pada pria. Insidensi dan keparahan AGA juga dilaporkan lebih sering terjadi pada pria ras Kaukasia dibandingkan ras lain.^{4,5} EH-MSK adalah vesikel lipid yang berasal dari sel punca mesenkimal (MSC) yang dapat berperan dalam berbagai pengobatan. EH-MSK dapat digunakan untuk meningkatkan aktivitas regeneratif, melindungi saraf, dan regenerasi jaringan. Efek terapeutik MSC ini dihasilkan dari transdiferensiasi sel punca, fusi sel, transfer mitokondria, dan efek parakrin sel. Faktor parakrin, termasuk kemokin, sitokin, dan faktor pertumbuhan.¹⁵

Diperkirakan AGA mempengaruhi sekitar 50% pria ras Kaukasia pada kelompok usia 50 tahun. Hasil penelitian di Singapura terkait dengan AGA pada pria menunjukkan prevalensinya berkisar 63%. Sesuai penelitian juga

menemukan sekitar 59,3% kasus AGA ini terkait dengan riwayat keluarga yang bisa diturunkan dari ayah dengan kondisi alopesia androgenik.^{6,7} AGA menjadi salah satu penyebab paling umum pasien datang berkonsultasi mengenai masalah rambut dengan pola spesifik yang ditandai miniaturisasi rambut. Kondisi AGA sering menyebabkan tekanan psikologis, rasa tidak percaya diri, hingga penurunan kualitas hidup penderitanya². Dalam sebuah penelitian yang dilakukan oleh Alfonso di antara pasien dengan AGA, mayoritas dari mereka melaporkan bahwa kerontokan rambut mempengaruhi daya tarik pribadi dan kehidupan sosial mereka.² Akibatnya, memahami masalah psikososial dan kualitas hidup pasien dengan alopesia androgenik menjadi masalah yang sangat memprihatinkan.³ Hubungan antara dihidrotestosteron dan perombakan jaringan yang diamati bersamaan dengan timbulnya AGA adalah ketegangan kulit kepala kronis yang ditransmisikan dari *galea aponeurotica* menginduksi respons inflamasi pada jaringan yang rentan terhadap alopesia androgenik, *dihidrotestosteron* meningkat pada jaringan yang rentan terhadap AGA sebagai bagian dari respons inflamasi ini dan dihidrotestosteron tidak secara langsung mengecilkan folikel rambut⁸.

SOCS memiliki peran penting dalam regulasi pertumbuhan rambut melalui pengaruhnya terhadap sinyal sitokin dan faktor pertumbuhan, dimana fokus utamanya SOCS3 mengatur respons imun dan inflamasi dalam tubuh.^{9,10} STAT3 berperan penting dalam menstimulasi transkripsi SOCS3 dengan cepat setelah pengikatan sitokin, dari jumlah yang hampir tidak terdeteksi dalam kondisi basal hingga peningkatan lebih dari 10 kali lipat

dalam mRNA dan ekspresi protein. STAT3 memiliki peran ganda dalam inflamasi, yaitu pro-inflamasi dan anti-inflamasi. STAT3 mengatur fungsi proliferasi dan migrasi neutrofil utama yang diperlukan untuk *granulopoiesis* darurat, dan juga membatasi durasi respons ini untuk mencegah peradangan yang merusak.⁶

Untuk alopecia, ada beberapa pilihan pengobatan, termasuk kortikosteroid topikal, injeksi, imunomodulator, dan terapi sel punca. Namun, metode saat ini belum memberikan hasil yang optimal dan tingkat remisi spontan juga masih tinggi.¹¹ Minoxidil adalah senyawa turunan piperidino-pirimidin dengan struktur kimia 2,6-diamino-4-piperidinopyrimidine-1-oksida dan rumus molekul $C_9H_{15}N_5O$. Minoxidil dulunya digunakan sebagai obat oral hipertensi. Namun karena efek sampingnya berupa hipertrikosis, mengarahkannya pada uji klinis minoxidil topikal dengan formula solusi 2% dan 5%. Keduanya menunjukkan efek pertumbuhan rambut dan pengurangan perontokan rambut secara lokal, dengan formula 5% lebih efektif. Minoxidil memiliki efek vasodilatasi. Vasodilatasi ini dapat meningkatkan proliferasi papila dermis melalui stimulasi faktor pertumbuhan. Adapun efek samping penggunaan obat ini perlu diwaspadai. Penggunaan minoxidil dapat menyebabkan dermatitis kontak iritan, pruritus, iritasi kulit kepala, hipertrikosis wajah, dan dermatitis kontak alergi.^{12,13} Penggunaan minoksidil masih memiliki keterbatasan dan dapat menimbulkan efek samping. Oleh karena itu, saya memilih untuk menggunakan *exosome* sebagai solusi untuk mengatasi masalah tersebut.

Exosome hipoxia mesenchymal stem cells (EH-MSC) diketahui bersifat antiinflamasi yang berperan dalam proliferasi sel karena mengandung berbagai jenis *growth factor* dan materi genetik seperti micro RNA (miRNA).^{14,16} Vesikel kecil yang dilepaskan oleh sel bernama *exosome* memiliki kemampuan untuk membawa berbagai molekul, termasuk protein seperti STAT3. *Exosome* memiliki kemampuan untuk mempengaruhi sel lain dengan mengirimkan protein seperti STAT3 untuk mengaktifkan jalur sinyal di sel penerima dan dianggap memiliki banyak peran, termasuk interaksi antar sel melalui *exosome* dan kemampuan *exosome* untuk berfungsi sebagai terapi untuk beberapa kondisi penyakit. STAT3 terkait alopesia dilaporkan berperan dalam pembentukan HF dan siklus rambut selama fase anagen kedua, dan sitokin yang berasal dari HF mengatur pergerakan sel dendritik ke kulit dan pemeliharaan sel T residen.¹⁷ *Exosome* juga dapat membawa berbagai molekul bioaktif seperti protein, RNA, dan mikroRNA, termasuk molekul-molekul yang mengatur atau dipengaruhi oleh jalur SOCS, terkait AGA. SOCS memiliki keterlibatan sitokin dan peradangan dalam proses miniaturisasi folikel rambut. Protein SOCS mengatur sinyal sitokin yang mengendalikan diferensiasi sel T CD4⁺ dan pematangan sel T CD8⁺ dari keadaan naif ke keadaan memori efektor. Peran protein SOCS dalam mengatur perkembangan penyakit autoimun secara bertahap.^{18,19}

Penelitian lain melaporkan Efektivitas Pengobatan *Exosome* pada Alopesia Androgenik.¹⁹ Terkait dengan kajian peran EH-MSC terhadap ekspresi SOCS3 sudah pernah ada pada *Alopecia Areata*, namun belum ada

penelitian lebih dalam pada Alopesia androgenik dan pada STAT3 terkait inflamasi dan apoptosis pada AGA masih terbatas, oleh karena itu masih perlu untuk dikaji.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* terhadap Ekspresi SOCS3 dan STAT3 pada Mencit C57BL6 yang diinduksi *Dihydrotestosterone*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum yang ingin dicapai penelitian ini adalah mengetahui pengaruh *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cells* terhadap ekspresi SOCS3 dan STAT3 yang diinduksi injeksi *Dihydrotestosterone* pada Mencit C57BL/6.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi SOCS3 pada Mencit C57BL/6 yang diinduksi *dihydrotestosterone* yang diberikan *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cells* 100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB dibandingkan kelompok kontrol.

1.3.2.2. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi STAT3 pada Mencit C57BL/6 yang diinduksi *dihydrotestosterone* yang diberikan *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cells* 100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB dibandingkan kelompok kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Variabel Bebas	Hasil
1.	Mert Ersan, et al, 2024 ¹⁴	Effectiveness of Exosome Treatment in Androgenetic Alopecia: Outcomes of a Prospective Study	Dilakukan analisis pelacakan nanopartikel (NTA),	Hasil NTA menunjukkan distribusi puncak karakteristik untuk eksosom berdiameter $139,7 \pm 2,3$ nm. Peningkatan kepadatan rambut yang signifikan secara statistik diamati pada minggu ke-4 dan ke-12 setelah perawatan ($p < 0,05$).
2.	Zhen Gao, et al, 2017. ¹⁷	SOCS3 treatment prevents the development of alopecia areata by inhibiting CD8+ T cell-mediated autoimmune destruction	Tingkat SOCS3 menurun pada manusia dan tikus dengan AA	SOCS3 menurunkan sel T CD8+ CD44 ^{high} CD62L ^{low} effector memory, yang mengakibatkan penurunan produksi IFN- γ . Ekspresi Fas dan kompleks histokompatibilitas mayor-1 (MHC I) meningkat pada kulit tikus alopecia areata C3H/HeJ, dan peningkatan ini ditekan oleh SOCS3.
3.	Hassan AS, et al, 2022. ²²	Expression of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 in Androgenetic Alopecia: A Case-Control Study	Pemeriksaan klinis lengkap dilakukan dan ekspresi gen STAT3 jaringan kemudian diukur dengan reaksi berantai	Jaringan kulit kepala yang terkena alopecia androgenik menunjukkan tingkat ekspresi gen STAT3 yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan daerah yang tidak terkena (androgen independen) ($p < 0,001$), tetapi tidak ditemukan hubungan

No	Peneliti, Tahun	Judul	Variabel Bebas	Hasil
			polimerase waktu nyata.	yang signifikan secara statistik antara tingkat ekspresi STAT3 jaringan dan tingkat keparahan kerontokan rambut ($p = 0,660$).
4.	Guiyue Wang MM, et al, 2023. ⁶⁰	Treatment of androgenetic alopecia by exosomes secreted from hair papilla cells and the intervention effect of LTF	Pemberian eksosom diisolasi dengan sentrifugasi diferensial pada suhu rendah	Regenerasi rambut signifikan pada tikus kelompok LTF, kelompok minoksidil, dan kelompok LTF-DPC-EXO, dan pertumbuhan rambut hanya terlihat pada kulit lokal pada kelompok model.

Berdasarkan kajian beberapa penelitian terdahulu, ditemukan bahwa telah dilakukan penelitian mengenai terapi alopesia, namun demikian belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cells* terhadap ekspresi SOCS3 dan STAT3 pada mencit C57BL/6 sehingga penelitian ini layak untuk dilakukan.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

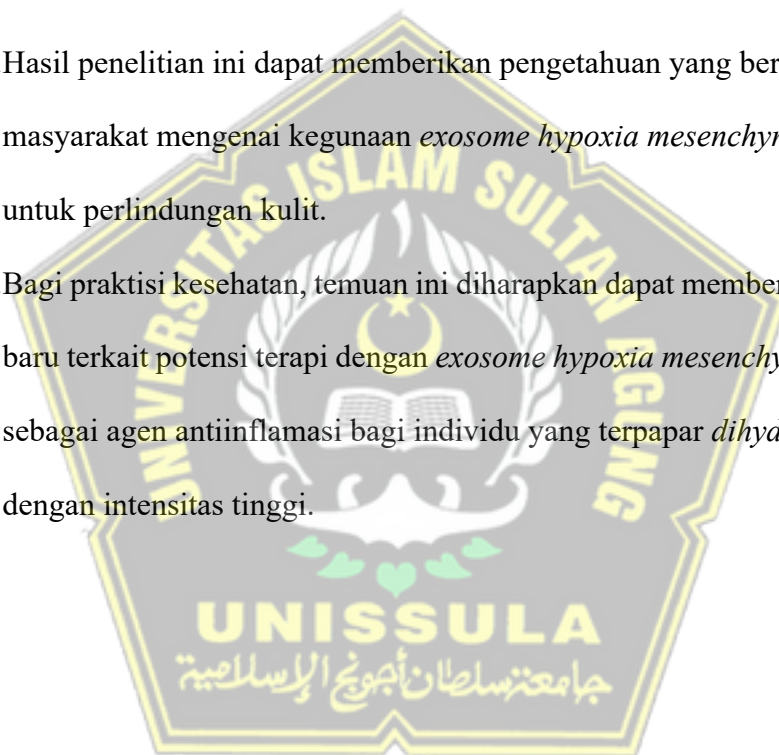
Manfaat yang ingin didapat dari penelitian ini adalah memberikan bukti ilmiah peran *exosome mesenchymal stem cells* terhadap ekspresi SOCS3 dan STAT3 pada mencit C57BL/6 yang diinduksi *dihydrotestosterone*.

1.5.2. Manfaat Praktis

1.5.2.1. Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan yang berguna bagi

masyarakat mengenai kegunaan *exosome hypoxia mesenchymal stem cells* untuk perlindungan kulit.

1.5.2.2. Bagi praktisi kesehatan, temuan ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi dengan *exosome hypoxia mesenchymal stem cells* sebagai agen antiinflamasi bagi individu yang terpapar *dihydrotestosterone* dengan intensitas tinggi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alopecia

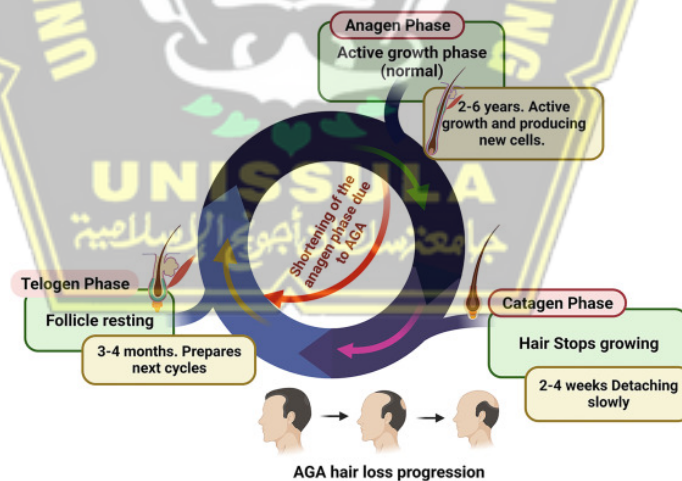
2.1.1. Definisi

Alopecia adalah penyakit yang umum terjadi di seluruh dunia yang utamanya disebabkan oleh genetika, gangguan hormonal, peradangan imun, malnutrisi, faktor lingkungan, gangguan mental, penuaan, dan faktor-faktor lainnya.^{24,25} Alopecia berarti kerontokan rambut terlepas dari jenis penyebabnya. Alopecia dapat dibagi menjadi dua kategori utama: jaringan parut (*cicatricial*) dan nonjaringan parut (*non-cicatricial*). Alopecia non-jaringan parut masuk ke dalam enam kategori utama yaitu *alopecia areata*, *alopecia androgenic*, *telogen effluvium*, alopecia traumatik, tinea kapitis, *anagen effluvium*. Alopecia jaringan parut dibagi menjadi tiga jenis utama: tinea kapitis, alopecia musinosa, dan alopecia neoplastik. Pada pria, distribusi kerontokan rambut khas terjadi di area vertex dan frontotemporal. Sedangkan pada wanita kerontokan rambut terjadi secara bertahap dan biasanya di daerah ubun-ubun .^{2,23}

2.1.2. Alopecia Androgenik (AGA)

Alopecia androgenik merupakan penyebab paling umum kerontokan rambut yang diperburuk oleh meningkatnya tekanan hidup, ketegangan, dan kecemasan. Meskipun alopecia androgenik (AGA) tidak berdampak signifikan pada kesehatan fisik, namun dapat berdampak negatif yang serius

pada kesehatan mental dan kualitas hidup pasien. seluruh kulit kepala bagian tengah, dengan keterlibatan minimal pada garis rambut bagian depan. AGA ini ditandai dengan pengurangan pada diameter, panjang dan pigmentasi rambut.^{3,26} Siklus pertumbuhan rambut normal terdiri atas tiga fase. Secara berturut-turut adalah anagen, katagen, dan telogen. Fase anagen berupa proliferasi sel epitel folikel rambut dan berlangsung selama 2-6 tahun. Fase katagen berupa apoptosis sel keratinosit, proses pigmentasi dan kondensasi papilla dermis, pembentukan rambut gada (*club hair*) yang berlangsung sekitar 2-3 minggu. Fase telogen atau fase istirahat merupakan fase rambut gada yang matur terdorong, terlepas dari akarnya, dan digantikan oleh folikel rambut dari fase anagen yang baru. Fase telogen berlangsung 5 minggu – 1000 hari.^{27,28}



Gambar 2.1 Efek yang dimediasi *androgen* pada siklus pertumbuhan rambut yang menyebabkan AGA. Aktivasi AR yang berlebihan mengakibatkan miniaturisasi folikel, memperpendek fase anagen dalam

siklus rambut. Batang rambut menjadi lebih tipis dan pendek, serta mungkin tidak menembus epidermis.⁵⁹

Androgen di vaskular masuk ke folikel rambut dan dimetabolisme menjadi dihidrotestosterone (DHT) yang akan berikatan dengan reseptor androgen di sel papilla dermis, sehingga terjadi perubahan produksi faktor-faktor regulasi yang mempengaruhi aktivitas sel papilla dermis, keratinosit, dan melanosit.²⁴

Pada AGA, terjadi perubahan durasi dari siklus pertumbuhan rambut akibat hormon androgen. Hormon androgen di sirkulasi masuk ke papila dermis melalui kapiler dan berikatan di reseptornya. Androgen terutama berikatan kuat pada reseptor androgen folikel rambut area frontal dan vertex. Androgen selanjutnya diubah menjadi bentuk aktifnya, *dihydrotestosterone* (DHT) dengan bantuan enzim 5 alfa-reduktase. Androgen yang telah aktif akan mengubah ekspresi gen sehingga produksi faktor pertumbuhan atau protein matriks ekstraseluler terganggu. Androgen juga menyebabkan perubahan pada interaksi sel epitel-mesenkim di dalam folikel rambut, ukuran papila dermis, mengganggu aktivitas keratinosit dan melanosit serta mengganggu *Wnt signaling pathway* yang berperan dalam regulasi pertumbuhan rambut. Perubahan-perubahan ini mengganggu siklus yang ditandai dengan pemendekan durasi fase anagen dan pemanjangan durasi fase telogen. Akibatnya terjadi miniaturisasi folikel, yakni kondisi rambut terminal berukuran kecil, tipis, dan kurang berpigmen. Selain itu, androgen juga mempengaruhi glandula sebacea sehingga kulit kepala

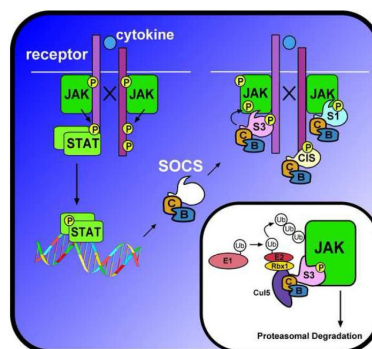
menjadi lebih berminyak dan ukurannya yang membesar dapat mengganggu pasokan darah ke folikel rambut.²⁸

Papila dermal dianggap sebagai target perubahan yang dimediasi androgen dalam siklus rambut dan miniaturisasi folikel. Ukuran papila menentukan ukuran umbi rambut dan rambut yang dihasilkan. Ukuran papila sebagian besar ditentukan oleh perubahan jumlah sel, namun perubahan matriks ekstraseluler dan suplai darah juga memengaruhi ukurannya. Sebuah penelitian terhadap 42 wanita mengungkapkan bahwa terdapat peningkatan jumlah folikel vellus seiring dengan meningkatnya keparahan kerontokan rambut pada wanita yang mengonfirmasi bahwa folikel terminal mengalami miniaturisasi.^{25,28}

2.2. SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*)

2.2.1. Definisi

SOCS3 adalah anggota keluarga protein SOCS yang berfungsi sebagai regulator negatif dalam jalur pensinyalan sitokin. Dengan menghambat aktivitas Janus kinase (JAK) dan mencegah fosforilasi STAT, SOCS3 mengatur respons imun dan inflamasi dalam tubuh.²⁹



Gambar 2.2 Mekanisme Kerja SOCS.²⁹

Secara umum, pengikatan sitokin pada reseptor kognat mengakibatkan aktivasi jalur JAK/STAT dan induksi transkripsi gen SOCS dengan cara yang bergantung pada STAT. Protein SOCS kemudian menghambat pensinyalan baik melalui penghambatan langsung aktivitas kinase JAK (SOCS1: S1), rekrutmen SH2 ke domain sitoplasma reseptor, diikuti oleh penghambatan aktivitas JAK (SOCS3: S3), maupun melalui kompetisi dengan domain STAT-SH2 untuk residu fosfotirosin reseptor spesifik (CIS, SOCS2). Tingkat regulasi tambahan disediakan oleh kompleks *ubikuitin-ligase* E3 yang terikat pada motif kotak SOCS, yang mengubikuitinasi protein terkait yang menargetkannya untuk degradasi proteasomal (inset).²⁹

2.2.2. Peran SOCS3 pada Alopecia

Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) adalah keluarga protein yang diproduksi sebagai respons terhadap sinyal dari berbagai macam sitokin dan faktor pertumbuhan dan yang bertindak untuk melemahkan transduksi sinyal sitokin.^{29,30}

2.3. STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription-3*)

2.3.1. Definisi

Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) adalah faktor transkripsi yang berperan penting dalam regulasi berbagai proses seluler, termasuk pertumbuhan sel, diferensiasi, dan respons imun. Aktivasi STAT3 terjadi melalui fosforilasi pada residu tirosin 705, menghasilkan bentuk aktif yang dikenal sebagai phosphorylated STAT3 (pSTAT3). Bentuk

aktif ini kemudian bertranslokasi ke inti sel untuk mengatur ekspresi gen target yang terlibat dalam berbagai proses fisiologis dan patologis.³¹

2.3.2. Peran STAT3 pada Alopecia

Transduser sinyal dan aktivator transkripsi (STAT3) termasuk dalam kelompok faktor transkripsi laten yang difosforilasi dan diaktifkan oleh beberapa protein tirosin kinase, termasuk anggota famili Janus kinase (JAK). Aktivasi jalur JAK-STAT dapat meningkatkan ketenangan dalam siklus rambut, dan pengobatan topikal pada kulit tikus dan manusia dengan inhibitor JAK terbukti menghasilkan pertumbuhan rambut yang cepat. Menunjukkan bahwa ekspresi gen STAT3 meningkat pada kulit kepala yang terkena AGA dibandingkan dengan area yang tidak terkena.³²

2.4. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSC)*

2.4.1. Definisi

Exosome dari *mesenchymal stem cells* (MSC) adalah vesikel ekstraseluler berukuran 30-150 nm yang berperan dalam komunikasi antar sel. Mereka memiliki marker permukaan spesifik seperti CD63, CD81, dan CD9, yang digunakan untuk identifikasi dan isolasi. *Exosome* dibagi berdasarkan ukuran menjadi tiga jenis utama: *small exosome* (30-50 nm), *medium exosome* (50-100 nm), dan *large exosome* (100-150 nm). *Exosome* MSC mengandung berbagai molekul bioaktif seperti miRNA, protein, dan lipida yang berkontribusi pada regenerasi jaringan, anti-inflamasi, dan modulasi imun, menjadikannya potensi besar dalam terapi medis.^{33,34}

2.4.2. Kandungan *Exosome* MSC

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

a. miRNA (MicroRNA)

Exosome MSC mengandung sejumlah miRNA yang diketahui mengatur ekspresi gen dan memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel. Misalnya, miRNA-218 dan miRNA-31 telah terbukti mendorong proliferasi sel dermal papilla dan merangsang pertumbuhan folikel rambut.^{33,34} Selain itu, miRNA-92a dan miRNA-146a memiliki sifat anti-inflamasi yang membantu mengurangi peradangan kulit kepala, yang sering dikaitkan dengan kerontokan rambut.³⁴

b. Protein dan Enzim

Gen STAT3 merupakan bagian dari keluarga yang dikenal sebagai gen STAT. Gen ini memberikan instruksi untuk membuat protein yang merupakan bagian dari jalur sinyal kimia penting dalam sel.

SOCS3 merupakan protein yang menghambat sinyal sitokin (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*).

c. Lipida

Komponen lipida dalam *exosome* MSC juga memainkan peran dalam memodulasi respon seluler dan menjaga integritas membran sel. Lipida seperti *ceramide* dan *sphingomyelin* dapat berperan dalam proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan, yang mendukung lingkungan yang sehat untuk pertumbuhan rambut.³³

d. *Cytokine dan Growth Factors*

SOCS3 merupakan protein yang mengatur sinyal sitokin, faktor pertumbuhan, dan hormon. STAT3 merupakan mediator ekspresi gen yang diinduksi oleh sitokin dan faktor pertumbuhan.

2.4.3. Metode Isolasi Exosome MSC

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

a. Ultrasentrifugasi Diferensial

Metode ini adalah yang paling umum digunakan untuk isolasi *exosome*. Proses ini melibatkan beberapa tahap sentrifugasi pada kecepatan yang berbeda untuk menghilangkan sel, debris seluler, dan partikel-partikel yang lebih besar. Pertama, medium kultur disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk menghilangkan sel-sel dan debris besar. Supernatan kemudian disentrifugasi pada kecepatan

lebih tinggi untuk mengendapkan mikrovesikel dan partikel yang lebih besar dari *exosome*. Akhirnya, supernatan disentrifugasi pada kecepatan sangat tinggi (100,000-120,000 x g) untuk mengendapkan *exosome*. Pellet *exosome* kemudian dicuci dan disentrifugasi ulang untuk meningkatkan kemurnian.³⁴

b. Ultrafiltrasi

Metode ini menggunakan membran filter dengan ukuran pori tertentu untuk memisahkan *exosome* berdasarkan ukuran. Medium kultur difiltrasi melalui membran untuk menghilangkan partikel yang lebih besar dan molekul kecil, sementara *exosome* tertahan di membran. Ultrafiltrasi sering digunakan sebagai langkah tambahan setelah ultracentrifugasi untuk meningkatkan kemurnian *exosome*.³⁸

c. Kromatografi Afinitas

Metode ini memanfaatkan interaksi spesifik antara molekul di permukaan *exosome* dengan ligan yang terikat pada matriks kromatografi. Antibodi yang spesifik terhadap marker permukaan *exosome* seperti CD63, CD81, dan CD9 sering digunakan. Medium kultur dilewatkan melalui kolom yang mengandung ligan ini, sehingga *exosome* yang mengandung marker permukaan yang sesuai akan terperangkap dan kemudian dielusi.³⁴

d. Presipitasi Polimer

Metode ini melibatkan penggunaan polimer, seperti *polyethylene glycol* (PEG), yang menginduksi presipitasi *exosome* dari medium

kultur. Polimer ini ditambahkan ke medium kultur dan diinkubasi, kemudian campuran disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk mengendapkan *exosome*. Metode ini relatif cepat dan sederhana, namun bisa menghasilkan *exosome* dengan kemurnian yang lebih rendah dibandingkan metode lain.³⁵

e. Isolasi Berdasarkan Densitas

Metode ini melibatkan penggunaan gradien densitas, seperti *gradien sucrose* atau *iodixanol*, untuk memisahkan *exosome* berdasarkan densitas mereka. Medium kultur ditempatkan pada gradien densitas dan disentrifugasi pada kecepatan tinggi. *Exosome* akan terpisah pada lapisan yang sesuai dengan densitas mereka, yang kemudian dapat diambil secara terpisah.^{36,37}

2.4.4. Hipoksia

Hipoksia mengacu pada tidak adanya suplai oksigen ke jaringan. Berbagai jenis sel berada dalam keadaan hipoksia dalam waktu lama yang dapat menyebabkan apoptosis sel. Sejumlah besar penelitian menunjukkan bahwa lingkungan hipoksia dapat menyebabkan adhesi, proliferasi, dan pembaruan sel induk mesenkim. Lingkungan hipoksia menyebabkan sintesis molekul faktor yang diinduksi hipoksia (HIF), yang membantu sel induk mesenkim menghasilkan lebih banyak sitokin.^{36,37}

2.5. Efek *Exosome hypoxia mesenchymal stem cells* terhadap ekspresi SOCS3 dan pada STAT3 pada alopecia

Exosome mengandung faktor pertumbuhan, sitokin, dan mikroRNA yang dapat memodulasi jalur pensinyalan yang terlibat dalam perkembangan dan regenerasi folikel rambut. Exosome menstimulasi proliferasi folikel rambut, mempercepat transisi dari fase telogen ke fase anagen, dan melindungi sel folikel rambut terhadap spesies oksigen reaktif. Exosome berperan penting dalam memperbaiki kerontokan rambut atau alopecia. Exosome ini dapat memodulasi ekspresi SOCS3 dan STAT3, di mana penurunan ekspresi SOCS3 dan peningkatan STAT3 berpotensi untuk memperbaiki folikel rambut dan merangsang fase pertumbuhan anagen pada alopecia. Jalur pensinyalan STAT3 memainkan peran penting dalam regulasi siklus pertumbuhan rambut dan respon terhadap kerusakan folikel. Aktivasi STAT3 dapat merangsang folikel rambut untuk memasuki fase pertumbuhan anagen.^{38,39} SOCS3 mengatur respons imun dan inflamasi dalam tubuh.³⁰

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Alopesia androgenik (AGA) adalah kondisi yang ditandai oleh kerontokan rambut progresif yang dipengaruhi oleh faktor genetik dan hormonal. Faktor genetik dan usia yang mempengaruhi mekanisme androgen, menyebabkan rambut vellus menjadi rambut terminal yang lebih panjang, tebal, dan gelap serta cacat pada mekanisme ini memungkinkannya berfungsi secara berbeda dengan merangsang folikel rambut untuk berdegenerasi menjadi rambut vellus.^{40,42} Testosteron meningkatkan laju metabolisme, dan testosteron tingkat tinggi diperlukan untuk produksi perhiasan seksual, yang mengubah keseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan antioksidan, yang menyebabkan peningkatan risiko stres oksidatif pada sel folikel rambut.⁴¹ Kelebihan ROS merusak komponen seluler penting seperti DNA, protein, dan lipid, yang pada akhirnya mengganggu fungsi normal folikel rambut dan memulai proses inflamasi.^{43,44} STAT3 mitokondria juga terlibat dalam kontrol siklus gamma-glutamil, produksi glutathione dan regulasi spesies oksigen reaktif (ROS).⁴⁵ ROS merangsang pelepasan SOCS3 melalui inaktivasi proteasom. Fungsi proteasom makrofag alveolar oleh oksidan lingkungan mikro merupakan penentu penting pengemasan dan sekresi protein SOCS3 sitosolik dalam EV. Vesikel ekstraseluler (EV) mengandung

beragam muatan molekuler yang mengubah fenotipe dan fungsi seluler setelah internalisasi oleh sel penerima.⁴⁶

Pada AGA, dihidrotestosteron (DHT) menstimulasi sekresi faktor penghambat pertumbuhan rambut, dimana ROS memediasi respons terhadap DHT dan faktor pertumbuhan, yang pada gilirannya dapat memengaruhi pensinyalan faktor pertumbuhan di dalam sel.⁴⁷ ROS diaktifkan lewat I κ Ba dan menghambat persinggahan NF- κ B juga ROS dapat menginduksi apoptosis. Aktivasi berlebihan jalur IKK/NF- κ B ditemukan dalam berbagai kondisi patologis, seperti penyakit inflamasi kronis, dan alopecia androgenik.⁴⁸ NF- κ B dan IKK dapat berinteraksi satu sama lain di jalur inflamasi dan mengatur ekspresi gen yang memainkan peran penting dalam proses peradangan dan apoptosis IKK terfosforilasi (p-IKK) mengaktifkan penghambat NF- κ B, alfa (I κ B α) ke dalam fase fosforilasi. I κ B α terfosforilasi kemudian diubikuitinasi dan didegradasi oleh proteasom dan NF- κ B aktif dilepaskan. NF- κ B bertranslokasi ke nukleus, tempat ia mengaktifkan produksi gen proinflamasi dan proapoptotik. Kompleks IKK terdiri dari tiga subunit utama yaitu IKK α , IKK β , dan IKK γ (juga dikenal sebagai NEMO). Peran utama IKK yaitu fosforilasi I κ B IKK memfosforilasi I κ B pada dua residu serin spesifik (Ser32 dan Ser36). Fosforilasi ini menandai I κ B untuk degradasi oleh proteasom, yang membebaskan NF- κ B dari kompleksnya dengan I κ B.⁴⁹ Translokasi NF- κ B ke Nukleus, setelah I κ B terdegradasi, NF- κ B menjadi aktif dan ditranslokasikan ke nukleus untuk menginduksi ekspresi gen target, termasuk gen yang terlibat dalam peradangan (pro-inflamasi),

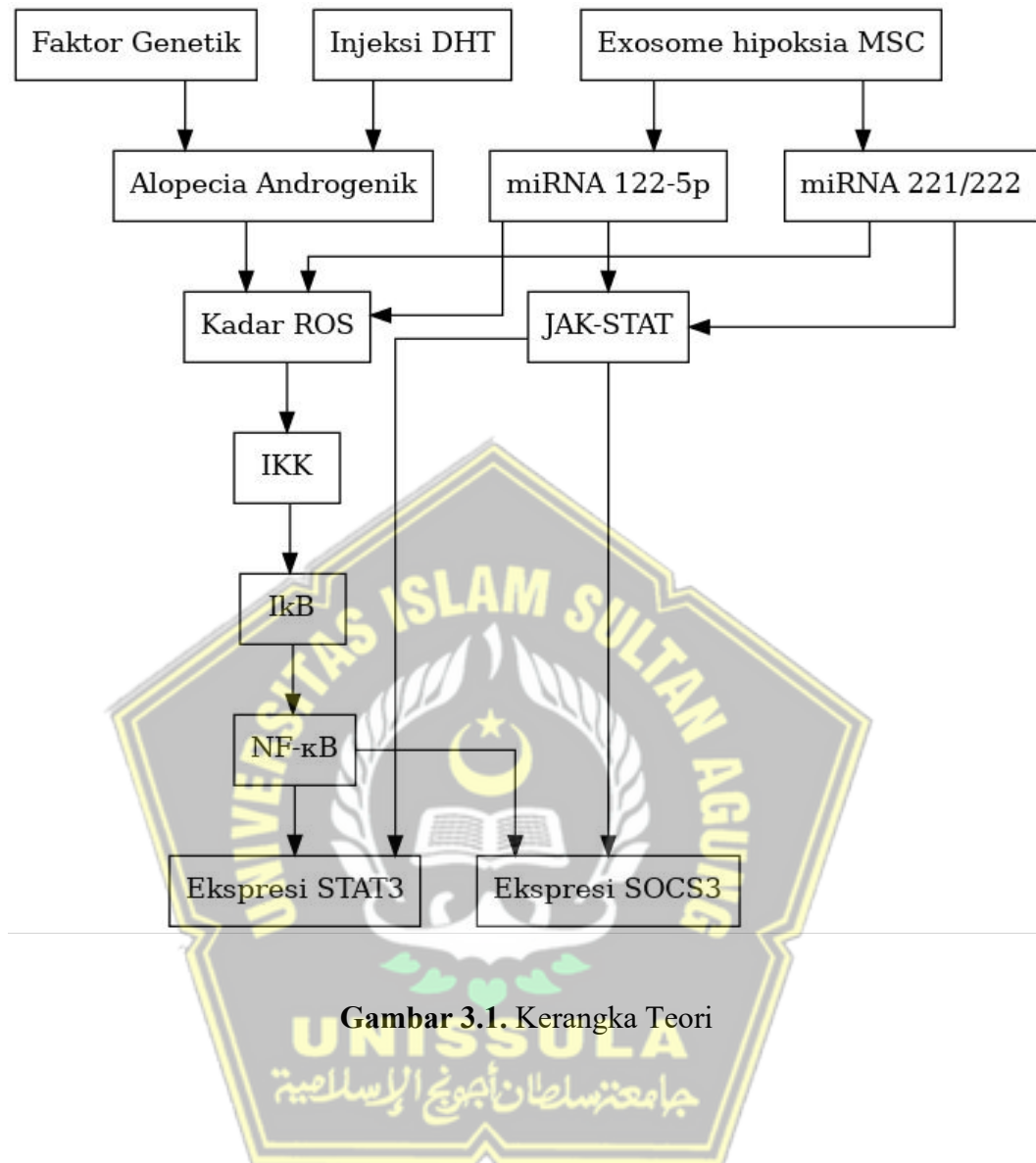
imun, dan apoptosis.⁵⁰ Caspase-8 mengaktifkan caspase-3, yang merupakan kaspase eksekutor utama dalam apoptosis. Caspase-8 dan caspase-3 berperan penting dalam apoptosis, yang merupakan proses kematian sel. Caspase 8 dan caspase 3 terkait dengan jalur apoptosis, yang bisa diinduksi oleh berbagai faktor seperti infeksi atau stres sel. Caspase-3 dan STAT3 memiliki kaitan dalam mengatur pertumbuhan sel dan apoptosis. STAT3 diidentifikasi sebagai yang diaktifkan secara spesifik dalam kondisi yang menginduksi apoptosis. Memanfaatkan siRNA yang menargetkan STAT3 menghasilkan pelemahan signifikan apoptosis yang diinduksi EGF. Selain itu, aktivasi STAT3 yang tidak bergantung pada EGFR melalui stimulasi sitokin mendorong apoptosis, sebagaimana diukur dengan pembelahan PARP dan Caspase-3.⁵¹ SOCS3 memengaruhi peradangan dan apoptosis adiposit : ekspresi gen SOCS3 yang berlebihan memicu peradangan adiposit dengan meningkatkan ekspresi IL-6 dan TNF- α , sekaligus menghambat leptin. TNF- α , mempercepat kaskade kaspase termasuk caspase 9 dan caspase 3. Kemudian, semuanya berkontribusi untuk menginduksi apoptosis adiposit melalui penghambatan aktivasi jalur pensinyalan JAK2/STAT3.⁵²

Exosome yang dihasilkan oleh MSC memiliki peran krusial dalam mengatur proses alopecia melalui berbagai protein dan miRNA yang terkandung di dalamnya. Yaitu, miRNA-221/222 berperan dalam mengatur siklus pertumbuhan rambut dengan memodulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi sel-sel folikel rambut.⁵³ Secara keseluruhan, kombinasi protein dan miRNA yang terdapat dalam *exosome* MSC bekerja sinergis

untuk mempengaruhi berbagai aspek alopecia, baik melalui pengaturan peradangan, regenerasi jaringan, maupun regulasi siklus pertumbuhan rambut secara langsung. Pemahaman mendalam terhadap mekanisme ini penting untuk mengembangkan terapi yang lebih efektif dalam mengatasi masalah kerontokan rambut yang disebabkan oleh alopecia.⁵⁴ DHT dapat mengganggu jalur β -catenin dan meningkatkan ekspresi SOCS3, yang dapat menghambat efek pertumbuhan rambut. Jalur *exosome* membawa miRNA yang berperan dalam pengaturan ekspresi gen terkait pertumbuhan rambut, termasuk β -catenin dan STAT3. Aktivasi STAT3 yang terganggu akibat peningkatan SOCS3 dapat mengurangi kemampuan folikel rambut untuk memasuki fase anagen. Penyembuhan atau pencegahan alopecia androgenik dapat melibatkan pendekatan yang menargetkan jalur-jalur molekuler ini, baik secara langsung maupun melalui modifikasi lingkungan mikro folikel rambut. SOCS3 adalah inhibitor klasik dari jalur sinyal sitokin yang dapat menghambat aktivasi STAT3. Penurunan ekspresi SOCS3 telah diamati pada kondisi inflamasi tertentu, yang dapat menyebabkan peningkatan aktivitas STAT3 dan NF- κ B. Interaksi antara STAT3 dan NF- κ B dapat mempengaruhi ekspresi gen pro-inflamasi. Fosforilasi STAT3 (STAT3) mengaktifkan faktor transkripsi ini, yang kemudian dapat berinteraksi dengan NF- κ B untuk mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam respons inflamasi. Aktivasi berlebihan dari STAT3 dan NF- κ B dapat berkontribusi pada kondisi patologi yang melibatkan inflamasi kronis. *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3) dan fosforilasi *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

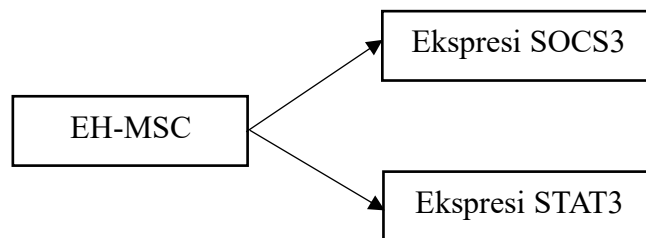
(STAT3) memainkan peran penting dalam berbagai jalur sinyal seluler yang terkait dengan dihidrotestosteron (DHT), faktor transkripsi NF- κ B, alopecia androgenik (AGA), dan Ekspresi *Reactive Oxygen Species* (ROS).⁵⁵ *Exosome* diharapkan dapat mengurangi peradangan melalui jalur SOCS3.⁵⁶





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* terhadap ekspresi SOCS3 dan STAT3 pada Mencit C57BL/6 yang diinduksi *dihydrotestosterone*.

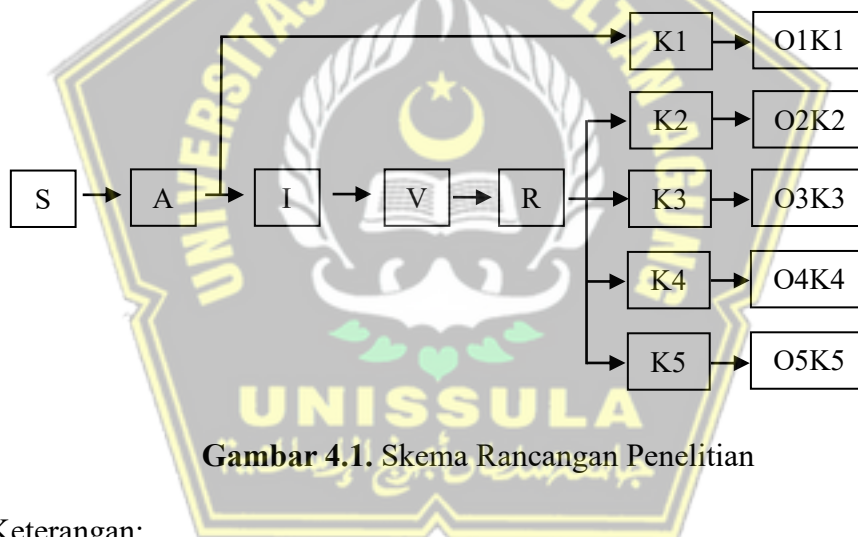


BAB IV

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

I = Induksi *dihydrotestosterone*

V = Validasi

R = Randomisasi hewan coba

K1 = Mencit C57BL/6 sehat, tidak diberi perlakuan

K2 = Mencit C57BL/6 diinduksi *dihydrotestosterone* dengan diberi NaCl 0,9%

K3 = Mencit C57BL/6 diinduksi *dihydrotestosterone* dengan diberi Minoxidil 5%

K4 = Mencit C57BL/6 diinduksi *dihydrotestosterone* dengan diberi Exosome hypoxia MSC 100 µg/kgBB

K5 = Mencit C57BL/6 diinduksi *dihydrotestosterone* dengan diberi *exosome hypoxia* MSC 200 µg/kgBB

O1K1 = Observasi ekspresi SOCS3 dan STAT3 kelompok K1

O2K2 = Observasi ekspresi SOCS3 dan STAT3 kelompok K2

O3K3 = Observasi ekspresi SOCS3 dan STAT3 kelompok K3

O4K4 = Observasi ekspresi SOCS3 dan STAT3 kelompok K4

O5K5 = Observasi ekspresi SOCS3 dan STAT3 kelompok K5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel penelitian

- a. Variabel Bebas penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *exosome hypoxia* MSC
- b. Variabel Tergantung penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi SOCS3 dan STAT3
- c. Variabel Prakondisi penelitian ini adalah pemberian *dihydrotestosterone* secara injeksi.

4.2.2. Definisi Operasional

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

Exosome dari *mesenchymal stem cells* (MSC) adalah vesikel ekstraseluler yang mengandung berbagai molekul bioaktif seperti miRNA, protein, dan lipida yang berkontribusi pada regenerasi jaringan, anti-inflamasi, dan

modulasi imun. *Exosome* MSC diisolasi dengan metode TFF. Media kultur disaring menggunakan filter 100 kDa dan 500 kDa. Validasi dilakukan dengan flow cytometry menggunakan penanda CD81, CD63, dan CD9. *Exosome hypoxia* MSC yang tervalidasi disimpan di tabung 2,5 mL pada suhu 2-8 °C. Injeksi *exosome* terbagi dalam beberapa kelompok yaitu kelompok K4 diberikan EH-*MSC* dosis $\mu\text{g/kgBB}$ dan kelompok K5 diberikan EH-*MSC* dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$

Skala: Ordinal

4.2.2.2. Ekspresi SOCS3

Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) merupakan keluarga protein yang diproduksi sebagai respons terhadap sinyal dari berbagai macam sitokin dan faktor pertumbuhan. Pada mencit C57BL/6 yang diinduksi oleh *dihydrotestosterone*, pemberian *exosome* MSC dapat mengurangi ekspresi SOCS3 pada mencit C57BL/6. Diukur menggunakan teknik PCR (*Polymerase chain reaction*) dari sampel kulit mencit C57BL/6 setelah perlakuan dengan *exosome* MSC.

Skala: Rasio

4.2.2.3. Ekspresi STAT3

Signal Transducer and Activator of Transcription 3

(STAT3) merupakan faktor transkripsi yang berperan penting dalam regulasi berbagai proses seluler, termasuk pertumbuhan sel, diferensiasi, dan respons imun. Pemberian *exosome* MSC dapat meningkatkan ekspresi STAT3 pada mencit C57BL/6 yang telah diinduksi oleh *dihydrotestosterone*. Diukur menggunakan teknik PCR (*Polymerase chain reaction*) dari sampel kulit mencit C57BL/6 setelah perlakuan dengan *exosome* MSC.

Skala: Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek penelitian

Mencit C57BL/6 berusia 6-8 minggu dengan berat 20-25 gram dipilih untuk penelitian ini setelah dianggap layak oleh dokter hewan dari Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Indonesia. Mencit C57BL/6 dipelihara di lab berventilasi cukup dan suhu ruangan 20-28°C dengan makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria inklusi

- a. Mencit C57BL/6

- b. Jenis kelamin jantan
- c. Usia 6-8 minggu
- d. Berat badan 20-25 g
- e. Tidak memiliki kelainan anatomi

4.3.2.2. Kriteria eksklusi

- a. Mencit C57BL/6 yang diberikan injeksi DHT tidak mengalami alopesia
- b. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
- c. Mencit C57BL/6 yang sakit selama masa penelitian.

4.4. Besar Sampel

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

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

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

Berdasarkan perhitungan tersebut, penelitian menggunakan lima ekor sampel per perlakuan. Untuk menghadapi risiko mortalitas pada mencit C57BL/6, setiap kelompok ditambah sampel sebanyak satu ekor dari jumlah hitungan menjadi total enam ekor per perlakuan. Kemudian diperlukan juga mencit C57BL/6 berjumlah 4 ekor sebagai perlakuan Validasi. Dengan demikian, jumlah total sampel yang digunakan adalah 34 ekor.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat Penelitian

Peralatan kultur sel, termasuk Biosafety Cabinet (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, peralatan bedah, dan labu 25T, dipergunakan pada saat ini. Ruang hipoksia dipergunakan menciptakan kondisi yang diperlukan untuk kultur hipoksia. Konsentrasi oksigen di ruang hipoksia diukur menggunakan pengukur oksigen. Selain itu, penyeka steril dipergunakan pada riset ini guna injeksi EH-MSCs dan dihidrotestosteron dipergunakan dalam menginduksi gejala mirip AGA. Instrumen guna menganalisis ekspresi gen SOCS3 dan STAT3.

4.5.2. Bahan Penelitian

Bahan kultur yang dipergunakan pada riset ini antara lain tali pusat mencit C57BL/6, NaCl 0,9%, DMEM, FBS, PBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan alkohol 70%, PBS, Xylasine, ketamine, dan gel berbahan dasar air menjadi bahan yang dipergunakan dalam proses pengobatan.

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. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cells* dari Umbilical Cord

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

- a. Setelah dikumpulkan, umbilical cord dimasukkan ke dalam wadah steril yang diberi NaCl 0,9%
- b. Dengan menggunakan pinset, masukkan umbilical cord ke dalam cawan petri dan gunakan PBS untuk membersihkannya secara menyeluruh
- c. Umbilical cord janin mencit C57BL/6 dipotong dan pembuluh darahnya dibuang
- d. Setelah umbilical cord dicincang halus, diletakkan secara merata di dalam labu 25T dan diamkan selama tiga menit agar tisu menempel pada permukaan labu
- e. Media (DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan sedikit demi sedikit hingga jaringan tertutup
- f. Eksplan disimpan dalam inkubator dengan 5% CO₂ pada suhu 37°C
- g. Setelah prosedur kultur dimulai, sel akan berkembang setelah sekitar 14 hari
- h. Setiap tiga hari, media diganti dengan cara membuang setengahnya dan menambahkan yang baru dan penuh sebagai gantinya
- i. Pemeliharaan sel berlanjut hingga 80% sel konfluensi.

4.6.3. Proses Hipoksia

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

4.6.4. Pembuatan Exosome Hipoksia MSCs

Exosome MSC diisolasi menggunakan metode TFF. Langkah yang dilakukan antara lain media kultur MSC dikumpulkan dalam botol steril dan kemudian disaring menggunakan alat uPulse TFF dengan filter 100 kDa dan 500 kDa untuk menyisihkan partikel besar. Hasil filtrasi kemudian dilakukan validasi kandungan *exosome hypoxia* MSC menggunakan flowcytometri dengan penanda permukaan berupa CD81, CD63, dan CD9. Hasil yang telah

tervalidasi mengandung *exosome hypoxia* MSC disimpan dalam tabung 2,5 mL dan disimpan dalam suhu 2-8 °C.

4.6.5. Pembuatan Alopesia dan Pemberian Perlakuan Pada Subjek Percobaan

- a. Setelah satu minggu adaptasi, mencit C57BL/6 diberikan kombinasi xylazine (20 mg/kgbb) dan ketamine (60 mg/kgbb) untuk menginduksi anestesi.
- b. Mencukur rambut pada mencit C57BL/6
- c. Mencit C57BL/6 kelompok K1 tidak di berikan treatmen apapun. Mencit C57BL/6 kelompok K2 sampai dengan K5 diberikan *dihydrotestosterone* 1 mg/hari selama 17 hari
- d. Hari ke-25 dilakukan validasi
- e. Dilakukan injeksi peritoneal pada mencit C57BL/6. Injeksi NaCL dilakukan pada K2, Topikal Minoxidil 5% pada K3, injeksi *exosome* hipoksia MSC dosis 100µg/kgbb hari ke 25 dan ke 32 sebanyak 2x (interval) pada K4 pada K4, dan Injeksi C57BL/6 hipoksia MSC dosis 200µg/kgbb hari ke 25 dan hari ke 32 sebanyak 2x (interval) pada K5
- f. Hari ke-39 dilakukan pemeriksaan sampel
- g. Jaringan yang telah dihomogenisasi disimpan dalam -80°C hingga proses analisis.
- h. Periksa ekspresi SOCS3 dan STAT3 menggunakan PCR sesuai

protokol pabrik.

4.6.6. Metode Validasi

- a. Validasi secara makroskopis pada hari ke-25 dimana dinyatakan positif jika daerah yang dicukur tidak menunjukkan pertumbuhan rambut kembali
- b. Validasi mikroskopis dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) dimana dinyatakan mengalami alopecia jika tidak ditemukan folikel dalam fase anagen pada kulit mencit C57BL/6. Untuk melakukan validasi mikroskopis dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:
 1. Sampel kulit diperoleh dari masing-masing kelompok dan digunakan untuk membuat potongan histologis menggunakan pewarnaan HE dan teknik paraffin Sampel kulit mencit C57BL/6 diperoleh dari masing-masing kelompok dan diawetkan dalam larutan NBF 10% atau Neutral Buffer Formalin
 2. Sampel kulit dibersihkan dari sisa larutan fiksatif dengan membilasnya menggunakan alkohol 70%
 3. Sampel ditandai dan ditempatkan dalam keranjang tisu setelah difiksasi dalam larutan BNF 10

4. Alkohol absolut dan alkohol bergradasi 70, 80%, 90%, dan 96% digunakan untuk mendehidrasi sampel jaringan
5. Sampel dimasukkan ke dalam toluol selama satu jam, atau hingga menjadi bening atau transparan
6. Sampel kemudian diinfiltrasi menggunakan parafin dalam oven bersuhu 56°C. Caranya dengan memasukkannya ke dalam kombinasi toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Masing-masing selama tiga puluh menit, sampel kulit direndam dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III
7. Kemudian sampel ditanam (embedding) dalam parafin dan blocking ditunggu hingga paraffin mengeras
8. Dengan menggunakan mikrotom, potong blok jaringan menjadi irisan berukuran 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
9. Sebelum pewarnaan jaringan, parafin dihilangkan (deparaffinisasi) dengan xylol selama sehari penuh
10. Pewarna HE digunakan untuk pewarnaan. Kertas kering digunakan untuk menyerap kandungan xylol, yang kemudian secara bertahap ditambahkan ke air sulingan dan larutan alkohol dengan persentase yang semakin rendah (96%, 90%,

80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30%), masing-masing, untuk durasi 1- 2 menit

11. Setelah jaringan diwarnai selama 5–10 detik dengan hematoksilin, jaringan dibilas lagi selama 10 menit dengan air mengalir

12. Selama 3-5 menit, preparata direndam dalam alkohol masing-masing 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%

13. Selanjutnya jaringan diwarnai dengan pewarnaan eosin selama 2 menit. Kemudian dikeringkan dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam larutan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, dan 96%) masing-masing selama 3-5 menit

14. Setelah 15 menit clearing xylol, balsam Kanada ditetaskan ke dalam sediaan histologi

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

4.6.7. Terminasi dan Pengambilan Jaringan

- a. Sebelum mengeluarkan organnya, matikan mencit C57BL/6 dengan dosis koktail yang mematikan. Ketamine 60 mg/kgBB dan Xylazine 20 mg/kgBB diperlukan untuk membuat 10 mL cocktail
- b. Organ kulit diambil dari bangkai mencit C57BL/6 dan diawetkan dalam RNA later pada suhu -80°C dalam cryotube bebas RNAase.

4.6.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

- a. Sampel kulit dimasukkan ke dalam tube berisi 300 μ L RNA later, kemudian disimpan dalam suhu -20°C
- b. Sampel kulit sebanyak 50 mg lalu dimasukkan ke dalam tube berisi 1 mL Trizol, kemudian dilakukan proses homogenisasi menggunakan ultrasonikator serta diinkubasi di suhu ruang selama 5 menit.
- c. Sampel ditambahkan dengan 0.2 mL kloroform dan pada suhu ruang sampel di inkubasi selama 2-3 menit.
- d. Setelah itu sampel disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan $12.000 \times g$.
- e. Sampel akan membentuk tiga lapis larutan, sisi bawah berwarna merah muda berisi protein, sisi tengah berwarna putih asap berisi DNA dan sisi atas berwarna bening berisi RNA (aqueous phase). Pisahkan aqueous phase di sisi atas ke tube yang berbeda.
- f. Sampel aqueous phase kemudian ditambahkan 0.5 mL isopropanol, kemudian diresuspensi, di inkubasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan $12000 \times g$ pada suhu 4°C selama 10 menit.
- g. Supernatant kemudian dibuang dan pellet ditambahkan dengan 1 mL 75% ethanol lalu diresuspensi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan $7500 \times g$ di suhu 4°C selama 5 menit.
- h. Supernatant kemudian dibuang dan pellet RNA ditambahkan

dengan 50 uL nuclease-free water (NFW).

- i. Konsentrasi sampel RNA kemudian dikuantifikasi menggunakan uDrop microplate reader.
- j. Sampel RNA sebanyak 0.1 ug dalam 1 uL kemudian ditambahkan 5 uL NFW dan dilakukan proses denaturasi dengan inkubasi di suhu 65 oC selama 5 menit menggunakan thermal cycler.
- k. Selama 5 menit dengan memanfaatkan thermal cycler sampel RNA kemudian diinkubasi dengan suhu 37oC lalu ditambahkan 2 uL 4x DN Master Mix.
- l. Selanjutnya ditambahkan 2 µL 5x RT Master Mix, dan thermal cycler dimanfaatkan guna menginkubasi campuran pada suhu 37°C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit, dan 98°C selama 5 menit.
- m. Sampel cDNA kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

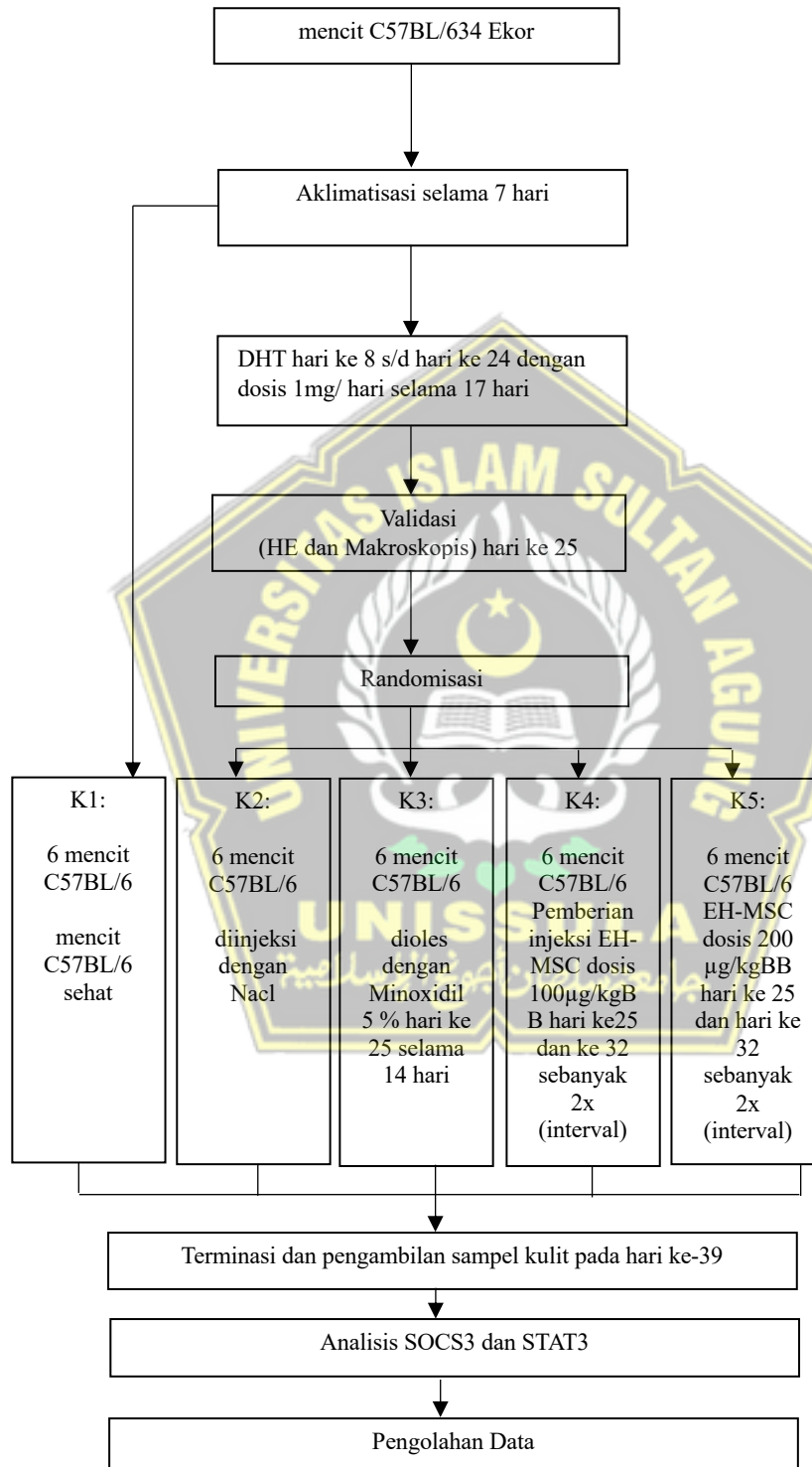
4.6.9. Pembacaan SOCS3/STAT3 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

- a. Dengan menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR), ekspresi gen SOCS3 dan STAT3 dianalisis.
- b. Lalu proses mencampuran 1 µL cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix sebanyak 10 µL, forward primer sebanyak 0.8 uL, reverse primer sebanyak 0.8 uL dan NFW 7.4 sebanyak uL.

- c. Primer SOCS3 yang digunakan dan Primer STAT3 yang digunakan
- d. Proses qPCR dilakukan menggunakan suhu 95 oC selama 2 menit, 95 oC selama 5 detik dan 56 oC selama 20 detik sebanyak 40 siklus. Proses qPCR dilakukan dengan menganalisis probe terhidrolisis pada panjang gelombang 520 nm.
- e. Dengan Software EcoStudy kuantifikasi data qPCR dilakukan.



4.7. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.8. Analisa Data

Hasil penelitian rerata ekspresi SOCS3 dilakukan menggunakan uji normalitas dengan uji Shapiro-Wilk didapatkan data yang terdistribusi normal ($p>0,05$). Uji Homogenitas pada ekspresi SOCS3 dilakukan dengan Levene's Test didapatkan hasil yang tidak homogen ($p<0,05$). Uji One-Way ANOVA dilakukan pada rerata ekspresi SOCS3 dan didapatkan hasil yang signifikan ($p<0,05$). Uji Post Hoc Tamhane diterapkan untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok.

Hasil penelitian rerata ekspresi STAT3 dilakukan menggunakan uji normalitas dengan uji Shapiro-Wilk, didapatkan data yang terdistribusi normal ($p>0,05$). Uji homogenitas pada ekspresi STAT3 dilakukan dengan Levene's Test didapatkan hasil yang tidak homogen ($p<0,05$). Uji One Way ANOVA dilakukan pada rerata ekspresi STAT3 dan didapatkan hasil yang signifikan ($p<0,05$). Uji Post Hoc Tamhane diterapkan untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok. Nilai signifikansi $p<0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.

4.9. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Bulan Mei sampai Juli 2025 di laboratorium Animal Model Research Center SCCR Indonesia.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

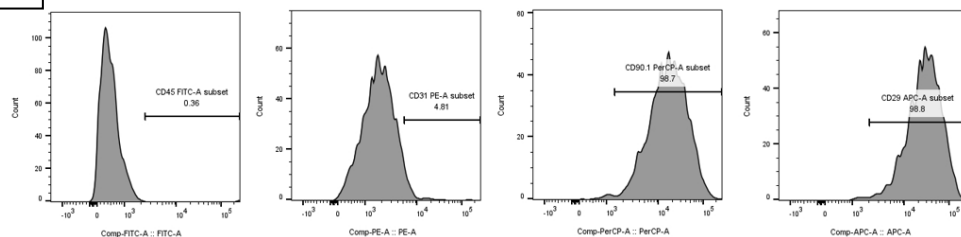
5.1.1. Hasil Validasi EH-MSC (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*)

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

A



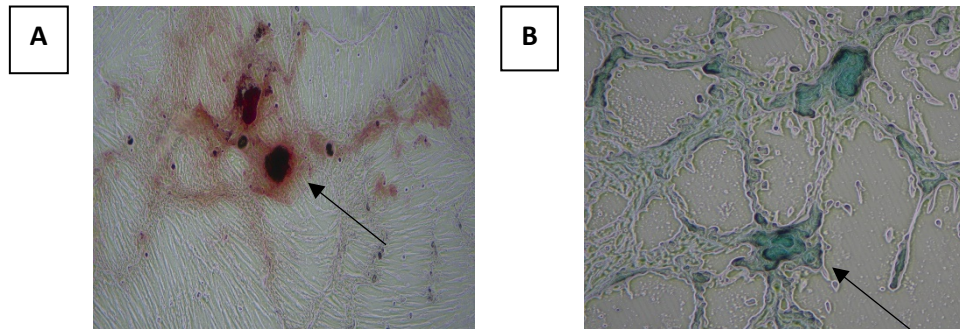
B



Gambar 5.3. Morfologi MSC. (A) morfologi MSC berbentuk fibroblas-like (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90, dan CD29.

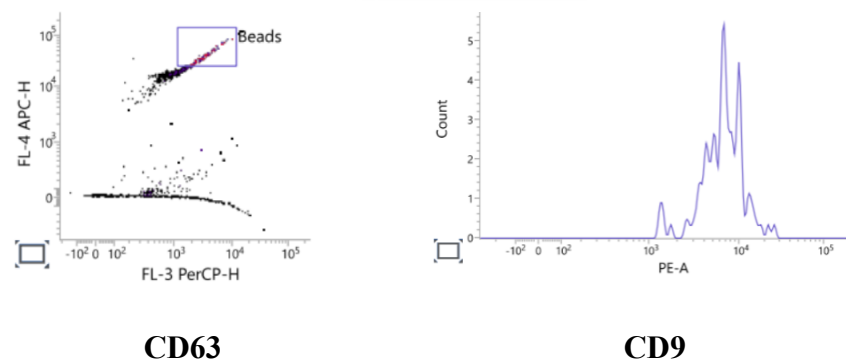
Analisis identitas sel menggunakan surface marker MSC menggunakan metode flowcytometry menunjukkan bahwa sel yang dikultur secara kuat mengekspresikan CD45 (0,36%) dan CD31 (4,81%), dan hanya sedikit mengekspresikan CD90 (98,7%) dan CD29 (98,8%) (Gambar 5.1B). Hal ini menunjukkan bahwa sel yang dikultur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

Penelitian ini juga memastikan kapasitas MSC dalam diferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa seperti sel osteosit dan sel kondrosit 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 chondrocyte yang terlihat oleh Alizarin Red dan Alician Blue. (Gambar 5.2 A dan B).



Gambar 5.4. Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin red dan (B) Adiposit pada pewarnaan oil red o (ditunjukkan dengan panah hitam, perbesaran 400x).

Setelah tervalidasi, MSC kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam menggunakan box hipoksia. Setelah itu, medium kultur MSC yang mengandung sekretom MSC dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode TFF dengan ukuran 100-500 kDa sehingga dapat diperoleh EH-MSC. Setelah diisolasi kadar *exosome* dianalisis menggunakan metode flowcytometry dan didapatkan bahwa kadar *exosome* yang didapatkan sebesar 80 ug/mL (Gambar 5.3).



Gambar 5.5. Hasil Analisis Kadar Exosome menggunakan marker CD63 dan CD9

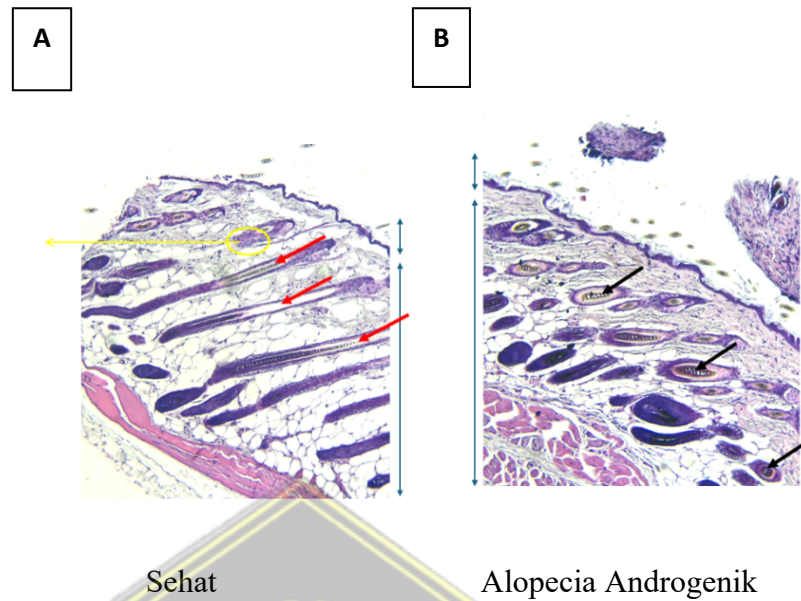
5.1.2. Hasil Validasi Alopecia Androgenik

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



Gambar 5.6. Validasi Alopecia Androgenik pada mencit

(A) Mencit yang dipapar *dihydrotestosterone* memiliki densitas rambut yang lebih rendah . sedangkan pada gambar (B) mencit sehat memiliki kondisi densitas rambut yang lebih tinggi.



Gambar 5.5. Hasil mikroskopis pasca pemberian EH-MSCs

Setelah mencit tervalidasi mengalami AGA, mencit yang tanpa induksi *dihydrotestosterone* digunakan sebagai kontrol sehat (K1), sedangkan mencit yang mengalami AGA akibat induksi *dihydrotestosterone* dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara acak yaitu K2 (tikus Alopecia Androgenik dengan injeksi Aquabid dengan NaCl), K3 (tikus Alopecia Androgenik dengan dioles minoxidil dengan dosis 5%), K4 dan K5 (tikus Alopecia Androgenik dengan injeksi EH-MSC dengan dosis masing-masing 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ secara subkutan).

Injeksi EH-MSC diberikan sekali pada hari ke-1 setelah tikus dinyatakan mengalami alopecia androgenik, dan pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-14 setelah injeksi. Jaringan kulit kemudian dihomogenisasi menggunakan RIPA buffer yang telah ditambahkan inhibitor proteinase untuk menghambat kerusakan protein. Setelah jaringan

terhomogenisasi menjadi suspensi, proses sentrifugasi dilakukan, dan supernatan dikumpulkan untuk analisis ekspresi SOCS3 dan STAT3 menggunakan metode PCR.

5.1.3. Ekspresi SOCS3

Tabel 5.2. Data Hasil Analisis Ekspresi SOCS3

Variabel	Kelompok					P
	K1 (pg/mL) Rerata±SD	K2 (pg/mL) Rerata±SD	K3 (pg/mL) Rerata±SD	K4 (pg/mL) Rerata±SD	K5 (pg/mL) Rerata±SD	
SOCS3	1,00±0,00	0,18±0,09	0,49±0,16	0,81±0,23	1,25±0,18	
Shapiro Wilk	0,00	0,34	0,48	0,13	0,20	
Lavene test						0,002
One Way Anova						<0,001

Data Ekspresi SOCS3 dari lima kelompok (K1 hingga K5) menunjukkan variasi yang signifikan dalam konsentrasi. Kelompok K5 memiliki ekspresi SOCS3 tertinggi, yaitu $1,25 \pm 0,18$ pg/mL, diikuti oleh K1 dengan $1,00 \pm 0,00$ pg/mL, dan K4 dengan $0,81 \pm 0,23$ pg/mL. Kelompok K3 memiliki ekspresi yang lebih rendah sebesar $0,49 \pm 0,16$ pg/mL, sementara ekspresi terendah ditemukan pada K2 dengan $0,18 \pm 0,09$ pg/mL.

Analisis distribusi data menggunakan uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa distribusi data pada setiap kelompok adalah normal ($p>0,05$). Selanjutnya, uji homogenitas varians menggunakan Levene test mengonfirmasi bahwa data ekspresi SOCS3 pada kelima kelompok memiliki varians yang tidak homogen ($p<0,05$).

Analisis perbedaan Ekspresi SOCS3 antar kelompok dilakukan menggunakan One-Way ANOVA, yang menghasilkan nilai signifikan secara statistik ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok-kelompok tersebut. Dengan kata lain, perlakuan atau kondisi pada setiap kelompok memberikan pengaruh yang signifikan terhadap Ekspresi SOCS3.

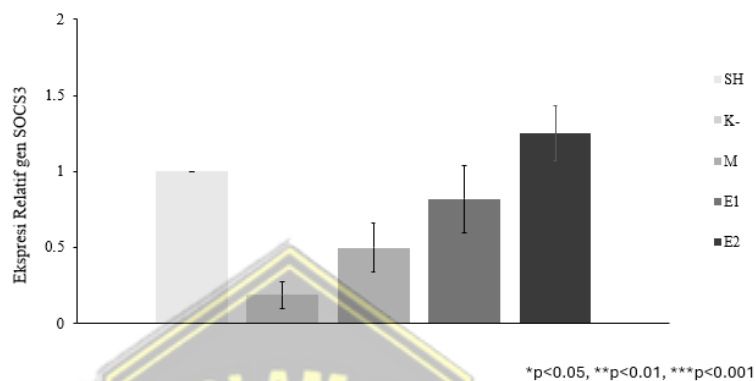
Tabel 5.2. Perbedaan rerata Ekspresi SOCS3 antar dua kelompok dengan

Uji Post Hoc Tamhene

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0,001
	K3	0,005
	K4	0,648
	K5	0,166
K2	K3	0,030
	K4	0,004
	K5	0,001
K3	K4	0,158
	K5	0,001
K4	K5	0,040

Berdasarkan data Ekspresi SOCS3 yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji post hoc Tamhane, karena data bersifat normal dan tidak homogen. Data hasil uji post hoc Tamhane tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.2. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K4 berbeda signifikan dibanding dengan seluruh ($p < 0,05$), sedangkan K5 berbeda secara signifikan dengan kelompok K2, K3, dan K4 ($p < 0,05$), dan tidak berbeda secara signifikan dibanding dengan K1 ($p > 0,05$). Data juga menunjukkan data Ekspresi SOCS3 K5 lebih tinggi

dibandingkan dengan kelompok lainnya hingga ke ekspresi SOCS3 yang sama dengan kelompok sehat.



Gambar 5.8. Grafik Ekspresi SOCS3.

Terdapat pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner dimana dosis tertinggi menghasilkan kenaikan ekspresi SOCS3 signifikan.

5.1.4 Ekspresi STAT3

Tabel 5.3. Data Hasil Analisis Ekspresi STAT3

Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	
STAT3	1,00±0,00	3,00±1,28	2,32±0,19	1,61±0,12	0,89±0,15	
Shapiro Wilk	0,00	0,51	0,72	0,10	0,91	
Lavene test						0,027
One Way Anova						<0,001

Data Ekspresi STAT3 yang diperoleh dari lima kelompok (K1 hingga K5) menunjukkan variasi yang signifikan dalam konsentrasinya. Kelompok K2 memiliki Ekspresi STAT3 tertinggi, yaitu $3,00 \pm 1,28$ pg/mL, diikuti oleh K3

dengan $2,32 \pm 0,19$ pg/mL, dan K4 dengan $1,61 \pm 0,12$ pg/mL. Kelompok K1 ditetapkan sebagai baseline dengan Ekspresi yaitu $1,00 \pm 0,00$ pg/mL. Sementara itu, Ekspresi STAT3 pada kelompok K5 dengan $0,89 \pm 0,15$ pg/mL mendekati nilai kelompok sehat (K1).

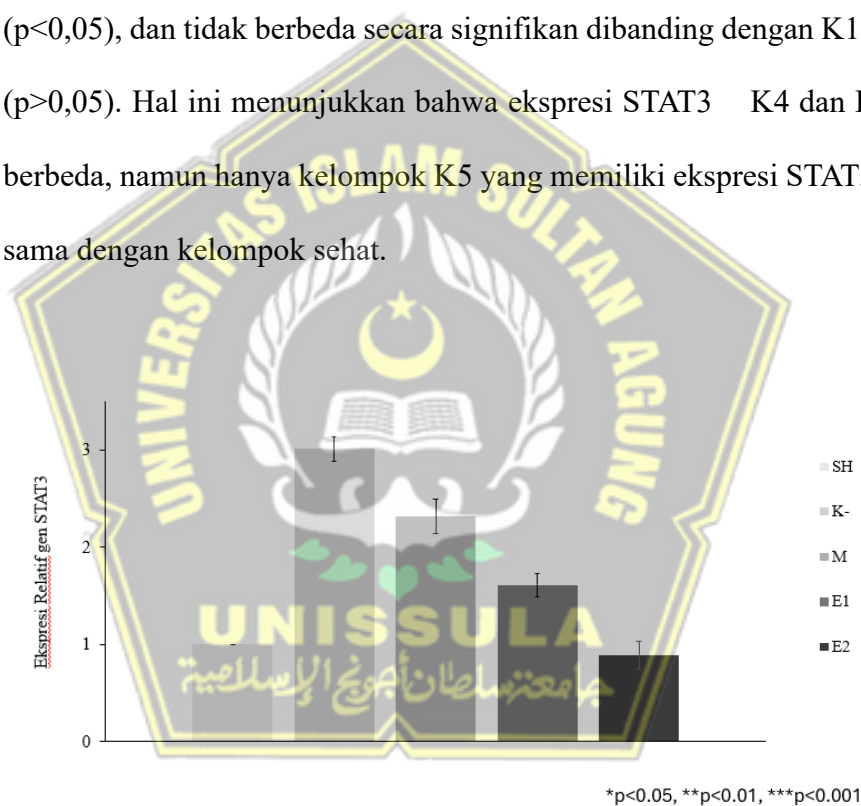
Uji statistik Shapiro-Wilk yang dilakukan untuk mengevaluasi distribusi data menunjukkan bahwa data ekspresi STAT3 pada semua kelompok memiliki distribusi normal ($p > 0,05$). Namun, analisis homogenitas varians menggunakan Levene test menunjukkan bahwa varians data antar kelompok tidak homogen ($p < 0,05$). Hasil analisis ini kemudian dilanjutkan dengan analisis perbedaan ekspresi STAT3 antar kelompok dilakukan menggunakan One-Way ANOVA, yang memberikan hasil signifikan secara statistik ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekspresi STAT3 antar kelompok.

Tabel 5.4. Perbedaan rerata Ekspresi STAT3 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0,001
	K3	0,001
	K4	0,001
	K5	0,725
K2	K3	0,001
	K4	0,001
	K5	0,001
K3	K4	0,001
	K5	0,001
K4	K5	0,001

Berdasarkan data ekspresi STAT3 yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi

hubungan antar kelompok, dilakukan uji Post Hoc Tamhane, karena data bersifat normal, namun tidak homogen. Data hasil uji post hoc Tamhane tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.4. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K4 berbeda signifikan dibanding dengan K1, K2, dan K3 ($p < 0,05$) dan tidak berbeda signifikan dibanding dengan K5 ($p > 0,05$), sedangkan K5 berbeda secara signifikan dengan kelompok K2 dan K3 ($p < 0,05$), dan tidak berbeda secara signifikan dibanding dengan K1 dan K4 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi STAT3 K4 dan K5 tidak berbeda, namun hanya kelompok K5 yang memiliki ekspresi STAT3 yang sama dengan kelompok sehat.



Gambar 5.9. Grafik Ekspresi STAT3

Terdapat pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner dimana dosis tertinggi menghasilkan Penurunan Ekspresi STAT3 yang kearah normal.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

EH-MSK telah banyak dikaji sebagai alternatif terapeutik yang menjanjikan dalam berbagai kondisi regeneratif dan inflamasi, termasuk dalam pengobatan alopesia androgenik.^{53–55} Salah satu mekanisme utama yang berperan dalam efek terapeutik EH-MSK adalah melalui pengiriman miRNA yang dikandung dalam exosome. MiRNA adalah molekul kecil yang dapat mengatur ekspresi gen dengan cara mengikat mRNA target, menghambat translasi, atau menyebabkan degradasi mRNA. Beberapa miRNA yang dikandung dalam EH-MSK, seperti miR-122 dan miR-221, terbukti memiliki peran penting dalam mengatur jalur biologis yang berkaitan dengan pengaturan ekspresi SOCS3 dan STAT3.^{56,57}

miR-122 adalah salah satu miRNA yang paling banyak diteliti dalam konteks regenerasi jaringan dan pengendalian inflamasi. Penelitian menunjukkan bahwa miR-122 dapat mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam pengaturan fibrosis dan peradangan. Dalam konteks alopesia, miR-122 dapat menstimulasi jalur SOCS3, yang berperan dalam modulasi respons inflamasi dan pengaturan proliferasi sel.^{56,57} SOCS3 memiliki peran utama dalam penghambatan aktivasi sel T pro-inflamasi, yang sering terlibat dalam kerusakan folikel rambut.^{58,59} Dengan meningkatkan ekspresi miR-122, EH-MSK dapat memicu produksi SOCS3, yang selanjutnya dapat membantu menurunkan reaksi inflamasi dan merangsang proses reparasi pada jaringan kulit yang rusak, termasuk folikel rambut.^{60–62}

Selain itu, miR-221 juga memainkan peran penting dalam pengaturan STAT3.⁶³ MiR-221 dapat meningkatkan ekspresi STAT3 melalui

pengaturan jalur proliferasi sel dan angiogenesis. Protein STAT3 sendiri berperan dalam proses perbaikan jaringan dan regenerasi folikel rambut, dengan cara merangsang pembentukan pembuluh darah dan meningkatkan suplai darah ke area yang rusak.^{64,65} Peningkatan kadar miR-221 dalam EH-MSC dapat mempercepat proses regenerasi folikel rambut dengan merangsang produksi STAT3, yang pada gilirannya dapat memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh alopecia dan mempercepat pertumbuhan rambut.⁶³⁻⁶⁵

Melalui mekanisme ini, miR-122 dan miR-221 yang terkandung dalam EH-MSC berfungsi sebagai mediator yang penting dalam meningkatkan ekspresi SOCS3 dan STAT3.⁶⁰⁻⁶⁵ Kedua protein ini memiliki peran kunci dalam pengaturan respons imun dan regenerasi jaringan, yang sangat relevan dalam pengobatan alopecia androgenik. SOCS3 dan STAT3 adalah dua protein yang memiliki peran penting dalam proses peradangan dan regenerasi jaringan. Ekspresi SOCS3 yang lebih tinggi dikaitkan dengan peningkatan proses reparatif pada jaringan kulit, termasuk pengaturan folikel rambut. SOCS3 berfungsi dalam pengaturan respons imun, penghambatan proliferasi sel T, serta pemeliharaan homeostasis jaringan, yang sangat relevan dalam mengatasi kondisi alopecia androgenik, yang ditandai dengan penurunan pertumbuhan rambut akibat kerusakan folikel. Di sisi lain, STAT3 berperan dalam proses proliferasi sel mesenkimal dan juga dalam perbaikan jaringan kulit yang rusak, termasuk pembentukan pembuluh darah dan penyembuhan luka. Peningkatan ekspresi STAT3 dapat mempercepat

regenerasi folikel rambut dengan meningkatkan pasokan oksigen dan nutrisi pada jaringan yang terlibat.^{60–65}

Pada penelitian ini, pemberian EH-MSC dengan dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ pada tikus model alopecia androgenik bertujuan untuk mengevaluasi efeknya terhadap ekspresi SOCS3 dan STAT3 serta hubungan kedua parameter ini dengan regulasi imun dan perkembangan alopecia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$ EH-MSC dapat meningkatkan ekspresi SOCS3 dan menurunkan ekspresi STAT3 secara signifikan hingga mencapai ekspresi yang setara dengan tikus sehat. Sementara itu, dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ hanya ada perubahan dalam peningkatan Ekspresi kedua protein tersebut, yang mengindikasikan bahwa dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dapat juga digunakan untuk efek terapeutik.

Peningkatan ekspresi SOCS3 yang signifikan pada kelompok tikus yang diberikan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ EH-MSC menunjukkan bahwa dosis tersebut berhasil mengaktifkan jalur-jalur biologis yang berperan dalam proses regenerasi kulit dan pertumbuhan rambut, yang selanjutnya berhubungan dengan pengurangan gejala alopecia. Sementara itu, ekspresi STAT3 yang menurun ke nilai normal juga berhubungan dengan peningkatan regenerasi jaringan kulit dan folikel rambut. STAT3 memiliki peran dalam pembentukan jaringan ikat dan angiogenesis, yang membantu meningkatkan suplai darah ke folikel rambut. Proses ini dapat mempercepat regenerasi dan mendukung pertumbuhan rambut baru pada tikus model alopecia. Selain itu, STAT3 juga berfungsi dalam memperbaiki defisiensi dalam pembentukan

kolagen, yang sangat penting dalam memperbaiki kerusakan folikel rambut akibat peradangan kronis.^{60–65}

Pemberian EH-MSC pada dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ juga dapat mempengaruhi keseimbangan Treg (Regulatory T cells), yang memainkan peran penting dalam mengontrol respons imun tubuh. Peningkatan aktivitas Treg dapat berkontribusi pada pengaturan sistem imun untuk menghindari serangan terhadap folikel rambut, yang sangat relevan dalam pengobatan alopesia, yang merupakan gangguan autoimun. Dengan meningkatkan jumlah Treg, EH-MSC berpotensi memperbaiki gangguan autoimun pada alopesia androgenik dengan mengurangi reaksi imun yang merusak folikel rambut.

Pemberian dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dapat meningkatkan Ekspresi SOCS3 dan STAT3 namun, dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$ EH-MSC lebih efektif dalam meningkatkan Ekspresi SOCS3 dan menurunkan STAT3 dibandingkan dengan dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ karena dosis yang lebih tinggi mengandung lebih banyak *exosome*, yang membawa berbagai molekul bioaktif seperti miR-122 dan miR-221. Molekul-molekul ini berperan penting dalam merangsang ekspresi gen yang mengatur regenerasi jaringan dan pengendalian peradangan. MiR-122 berperan dalam meningkatkan produksi TGF- β , yang mengurangi peradangan dengan menurunkan aktivitas sel imun pro-inflamasi, sementara miR-221 berfungsi dalam merangsang produksi STAT3 kedalam bentuk aktif pSTAT3, yang berperan dalam perbaikan folikel rambut dan pembentukan pembuluh darah.^{60–65}

Dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$ EH-MSC yang lebih tinggi meningkatkan produksi SOCS3 dan menurunkan STAT3 lebih signifikan, yang mempercepat proses regenerasi folikel rambut pada model alopecia androgenik. Perubahan ekspresi kedua protein ini membantu menurunkan kerusakan folikel rambut, memperbaiki suplai darah dan merangsang perbaikan jaringan kulit. Selain itu, dosis yang lebih tinggi juga dapat meningkatkan jumlah sel Treg yang mengendalikan respons imun, mengurangi kerusakan folikel rambut akibat peradangan. Oleh karena itu, dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$ EH-MSC lebih efektif dalam mengatasi alopecia androgenik dengan meningkatkan ekspresi SOCS3 dan menurunkan STAT3 secara signifikan.^{58,69-73}

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dapat meningkatkan Ekspresi SOCS3 dan menurunkan STAT3 namun, dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$ EH-MSC lebih meningkatkan Ekspresi SOCS3 dan menurunkan STAT3 secara signifikan, yang berhubungan langsung dengan regulasi sistem imun melalui penurunan aktivitas sel CD8 dan CD4 serta peningkatan jumlah Treg. Hal ini mendukung potensi EH-MSC sebagai terapi yang efektif dalam mengatasi AGA dengan memodulasi respons imun dan meningkatkan regenerasi folikel rambut. Penurunan peradangan dan perbaikan jaringan yang difasilitasi oleh penurunan Ekspresi STAT3 dan peningkatan SOCS3 diharapkan dapat menjadi dasar untuk pengembangan terapi berbasis EH-MSC dalam pengobatan AGA.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan. Pertama perlu penyetaraan hewan uji ya untuk mendapatkan model hewan coba yang tervalidasi lebih optimal satunya dengan *pre-eliminary study* lebih lanjut. Kedua penelitian ini baru pada tahap hewan coba. Penelitian diharapkan dapat dilakukan ke tahap uji pada manusia agar segera diaplikasikan secara klinis. Ketiga diperlukan analisis lebih lanjut pada EH-MSC sebagai variabel bebas pada penelitian ini untuk menganalisis miRNA yang didapat, dengan tujuan untuk mengetahui fungsinya pada sel target.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi EH-MSC secara subcutan terhadap ekspresi SOCS3 dan STAT3 pada mencit C57BL/6 model alopecia androgenik menunjukkan hal-hal berikut:

- a. Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cells*) EH-MSC dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ terhadap peningkatan ekspresi SOCS3 pada mencit model alopecia androgenik dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- b. Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cells*) EH-MSC dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan 200 $\mu\text{g/kgBB}$ terhadap Penurunan Ekspresi STAT3 hingga batas normal pada mencit model alopecia androgenik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

- a. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengevaluasi efek jangka panjang pemberian EH-MSC pada alopecia androgenik serta dosis optimal yang memberikan keseimbangan terbaik antara efek regenerative dan anti-inflamasi.
- b. Studi klinis pada manusia dianjurkan untuk mengkonfirmasi keamanan dan efektivitas EH-MSC sebagai terapi biologis untuk alopecia androgenik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Asvini Darmaningrat¹ , Surya Ari ² , Suci Lousiana³ , Nurhidayati⁴ ¹, JUKEJ: Jurnal Kesehatan Jompa, Alopecia Androgenik, Vol. 1. No. 2 Desember 2022 e-ISSN: 2830-5558 p-ISSN: 2830-5744.
2. Alfonso M, Richter-Appelt H, Tosti A, Viera MS, García M. The psychosocial impact of hair loss among men: a multinational European study. *Curr Med Res Opin.* 2005 Nov;21(11):1829-36. doi: 10.1185/030079905X61820. PMID: 16307704.
3. Heilmann S, et al. WNT10A mutations and variants in AGA. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):694–703.
4. Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, Watowich SS. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Oct;31:1-15. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.001. Epub 2016 May 9. PMID: 27185365; PMCID: PMC5050093.
5. Cwynar A, et al. The impact of oxidative stress in androgenic alopecia in women. *Postep Derm Alergol.* 2020;37(1):119–20.
6. Tham SN, et al. Patterned hair loss in Singaporean men. *Int J Dermatol.* 2000;39(10):728–32.
7. Su LH, Chen TH. Association of androgenetic alopecia with family history. *Br J Dermatol.* 2007;157(6):1240–2.
8. Darbre PD. The link between DHT and inflammation. *Crit Rev Toxicol.* 2022;52(1):1–10.
9. Kubo M, et al. SOCS proteins in cytokine signaling. *J Leukoc Biol.* 2003;75(3):422–7.
10. Dhar K, Rakesh K, Pankajakshan D, Agrawal DK. SOCS3 promotor hypermethylation and STAT3-NF-κB interaction downregulate SOCS3 expression in human coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Mar 15;304(6):H776-85. doi: 10.1152/ajpheart.00570.2012. Epub 2013 Jan 18. PMID: 23335796; PMCID: PMC3602771.
11. Du F, Li J, Zhang S, Zeng X, Nie J, Li Z. Oxidative stress in hair follicle development and hair growth: Signalling pathways, intervening mechanisms and potential of natural antioxidants. *J Cell Mol Med.* 2024 Jun;28(12): e18486.

12. Blume-Peytavi U, et al. Systemic and topical use of minoxidil. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(3):541–53.
13. Rossi A, et al. Minoxidil-related contact dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(7):859–62.
14. Ersan M, Ozer E, Akin O, Tasli PN, Sahin F. Effectiveness of Exosome Treatment in Androgenetic Alopecia: Outcomes of a Prospective Study. *Aesthetic Plast Surg*. 2024 Nov;48(21):4262-4271. doi: 10.1007/s00266-024-04332-3. Epub 2024 Aug 22. PMID: 39174804; PMCID: PMC11588828.
15. Casado-Díaz A, et al. MSC-derived extracellular vesicles in skin regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:146.
16. Fan, H. dan Huang, F. (2024) Patogenesis dan Kemajuan Pengobatan Alopecia Androgenik. *Jurnal Biosains dan Kedokteran*, 12, 149-158. doi: 10.4236/jbm.2024.126014.
17. Gao Z, Jin YQ, Wu W. SOCS3 treatment prevents the development of alopecia areata by inhibiting CD8+ T cell-mediated autoimmune destruction. *Oncotarget*. 2017 May 16;8(20):33432-33443. doi: 10.18632/oncotarget.16504. PMID: 28418931; PMCID: PMC5464880.
18. Gokce N, Basgoz N, Kenanoglu S, Akalin H, Ozkul Y, Ergoren MC, Beccari T, Bertelli M, Dundar M. An overview of the genetic aspects of hair loss and its connection with nutrition. *J Prev Med Hyg*. 2022 Oct 17;63(2 Suppl 3):E228-E238. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2765. PMID: 36479473; PMCID: PMC9710406.
19. González-Cubero E, González-Fernández ML, Gutiérrez-Velasco L, Navarro-Ramírez E, Villar-Suárez V. Isolation and characterization of exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*. 2021;238(5):1203–17.
20. Greenhalgh CJ, Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm IGF Res*. 2004 Jun;14(3):200-6. doi: 10.1016/j.ghir.2003.12.011. PMID: 15125881.
21. Haggadone, MD; Mancuso, P.; Peters-Golden, M. Inaktivasi Oksidatif Proteasom Meningkatkan Sekresi Makrofag Alveolar pada SOCS3 Vesikular. *Sel* 2020 , 9 , 1589. <https://doi.org/10.3390/cells9071589>
22. Hassan AS, Al-Dhoun MQ, Shaker OG, AlOrbani AM. Expression of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 in Androgenetic Alopecia: A Case-Control Study. *Skin Pharmacol Physiol*. 2022;35(5):278-281. doi: 10.1159/000525532. Epub 2022 Jun 16. PMID: 35709697.

23. Aisyah ND. Pengaruh terapi kombinasi 5 titik akupunktur terhadap penurunan jumlah rambut rontok (Alopecia Androgenetic) pada wanita usia 31–50 tahun. Skripsi. Universitas Islam Sultan Agung; 2019.
24. Hassan AS, Al-Dhoun MQ, Shaker OG, AlOrbani AM. Expression of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 in Androgenetic Alopecia: A Case-Control Study. *Skin Pharmacol Physiol*. 2022;35(5):278-281. doi: 10.1159/000525532. Epub 2022 Jun 16. PMID: 35709697.
25. Kang H, et al. Alopecia: classification and histological evaluation. *J Pathol Transl Med*. 2020;54(6):444–58.
26. Kaliyadan F, et al. Androgenetic alopecia: An update. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2013;79(5):613–25.
27. Lolli F, et al. The role of hormonal pathways in alopecia. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):E329.
28. Kwack MH, et al. Dihydrotestosterone-inducible interleukin-6 regulates the proliferation of dermal papilla cells in human hair follicles. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37(1):62–9.
29. Kubo M, et al. SOCS proteins and regulation of JAK-STAT signaling. *J Leukoc Biol*. 2003;75(3):422–7.
30. Gao Z, Jin YQ, Wu W. SOCS3 treatment prevents the development of alopecia areata by inhibiting CD8⁺ T cell-mediated autoimmune destruction. *J Autoimmun*. 2017;83:1–12.
31. 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).
32. Kim JY, Rhim WK, Yoo YI, Kim DS, Ko KW, Heo Y, Park CG, Han DK. Defined MSC exosome with high yield and purity to improve regenerative activity. *J Tissue Eng*. 2021 Apr 20;12:20417314211008626. doi: 10.1177/20417314211008626. PMID: 33959246; PMCID: PMC8060739.
33. Li K, Sun Y, Liu S, Zhou Y, Qu Q, Wang G, Wang J, Chen R, Fan Z, Liu B, Li Y, Mao X, Hu Z, Miao Y. The AR/miR-221/IGF-1 pathway mediates the pathogenesis of androgenetic alopecia. *Int J Biol Sci*. 2023 Jun 26;19(11):3307-3323.
34. Liang Y, Tang X, Zhang X, Cao C, Yu M, Wan M. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Carrying MiR-122-5p Antagonize the

Inhibitory Effect of Dihydrotestosterone on Hair Follicles by Targeting the TGF- β 1/SMAD3 Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).

35. 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.
36. Liu, Zhenjiang Gan, Lu Zhou, Zhongjie Jin, Wei Sun, Chao 2015/09/09 SOCS3 promotes inflammation and apoptosis via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte VL - ER - https://www.researchgate.net/figure/SOCS3-affects-adipocyte-inflammation-and-apoptosis-over-expression-of-SOCS3-gene_fig6_281598314
37. Lee SH, et al. Hypoxic conditions induce the release of therapeutic EVs from human MSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(1):29–33.
38. Cao Z, et al. Exosomes with STAT3 in intercellular signaling. *iScience.* 2023;26(11):108236.
39. Hassan AS, et al. Expression of STAT3 in AGA. *J Cosmet Dermatol.* 2022;21(5):1927–32.
40. Marginean EC, Gotfrit J, Marginean H, Yokom DW, Bateman JJ, Daneshmand M, Sud S, Gown AM, Jonker D, Asmis T, Goodwin RA. Phosphorylated transducer and activator of transcription-3 (STAT3) immunohistochemical expression in paired primary and metastatic colorectal cancer. *Transl Oncol.* 2021 Feb;14(2):100996. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100996. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33341488; PMCID: PMC7750168.
41. Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation. *Int J Cosmet Sci.* 2005;27(1):17–34.
42. Liao W, et al. Reactive oxygen species mediate epidermal growth factor receptor activation-induced apoptosis in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2007;282(12):8493–501.
43. Morelli M, Madonna S, Albanesi C. SOCS1 and SOCS3 as key checkpoint molecules in the immune responses associated to skin inflammation and malignant transformation. *Front Immunol.* 2024 Jun 21;15:1393799. doi: 10.3389/fimmu.2024.1393799. PMID: 38975347; PMCID: PMC11224294.
44. Norma Dyanti Aisyah, Pengaruh Terapi Kombinasi 5 Titik Akupunktur Terhadap Penurunan Jumlah Rambut Rontok (Alopecia Androgenetic) Pada

Wanita Usia 31-50 Tahun, Jurnal Biosains Pascasarjana Vol. 21 (2019)
Sekolah Pasca sarjana Universitas Airlangga, Indonesia

45. 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>
46. Pan Q, Wang Y, Lan Q, Wu W, Li Z, Ma X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorate hypoxia/reoxygenation-injured ECs via transferring MicroRNA-126. *Stem Cells Int*. 2019;2019.
47. Paul S, Licona-Vázquez I, Serrano-Cano FI, Frías-Reid N, Pacheco-Dorantes C, Pathak S, Chakraborty S, Srivastava A. Current insight into the functions of microRNAs in common human hair loss disorders: a mini review. *Hum Cell*. 2021 Jul;34(4):1040-1050.
48. Ma RY, et al. Interaction between STAT3 and NF-κB pathway contributes to inflammation in cancer. *Cell Death Dis*. 2020;11(6):486
49. Perera E, Sinclair R. Androgenetic alopecia. In: Sacchidanand S, Somiah S, editors. *Scalp and its disorders*. Melbourne: Jaypee Publ.; 2015.Ch.11.p.1-13
50. Bowman T, et al. STATs in oncogenesis: a target for cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19(21):2474–88.
51. Reid EE, Haley AC, Borovicka JH, Rademaker A, West DP, Colavincenzo M, Wickless H. Clinical severity does not reliably predict quality of life in women with alopecia areata, telogen effluvium, or androgenic alopecia. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Mar;66(3):e97-102. doi: 10.1016/j.jaad.2010.11.042. Epub 2011 May 24. PMID: 21601948.
52. Ren, J., Zhu, B., Gu, G. dkk. Eksosom turunan sel Schwann yang mengandung MFG-E8 memodifikasi polarisasi makrofag/mikroglia untuk mengurangi peradangan melalui jalur SOCS3/STAT3 setelah cedera sumsum tulang belakang. *Cell Death Dis* **14**, 70 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05607-4>
53. Robert S. English, A hypothetical pathogenesis model for androgenic alopecia: clarifying the dihydrotestosterone paradox and rate-limiting recovery factors, *Medical Hypotheses*, Volume 111, 2018, Pages 73-81, ISSN 0306-9877, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.12.027>.
54. 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.

55. Shimizu Y, Ntege EH, Sunami H, Inoue Y. Regenerative medicine strategies for hair growth and regeneration: A narrative review of literature. *Regen Ther.* 2022 Oct 31;21:527-539. doi: 10.1016/j.reth.2022.10.005. PMID: 36382136; PMCID: PMC9637724.
56. Sincengile Ntshingila, Ogheneochuko Oputu, Afolake T. Arowolo, Nonhlanhla P. Khumalo, Androgenetic alopecia: An update, *JAAD International*, Volume 13, 2023, Pages 150-158, ISSN 2666-3287, <https://doi.org/10.1016/j.jdin.2023.07.005>.
57. Williamson D, Gonzalez M, Finlay AY. The effect of hair loss on quality of life. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2001 Mar;15(2):137-9. doi: 10.1046/j.1468-3083.2001.00229.x. PMID: 11495520.
58. 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).
59. 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).
60. Wang G, Wang Z, Zhang J, et al. Treatment of androgenetic alopecia by exosomes secreted from hair papilla cells and the intervention effect of LTF. *J Cosmet Dermatol.* 2023; 22: 2996-3007. doi:10.1111/jocd.15890

