

**PENGARUH FARMAKOLOGI KOMBINASI INJEKSI
INTRADERMAL *SECRETOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (SH-MSCs) DAN
MINOXIDIL TOPIKAL TERHADAP KADAR IGF-1
DAN MDA**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Jantan Galur Wistar Model
Alopecia like)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister
(S2)



Magister Ilmu Biomedik

Reynaldi Suryajaya

MBK.23.24.010465

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

TESIS

PENGARUH FARMAKOLOGI KOMBINASI INJEKSI INTRADERMAL *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (SH-MSCs) DAN MINOXIDIL TOPIKAL TERHADAP KADAR IGF-1 DAN MDA (Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Jantan Galur Wistar Model *Alopecia like*)

Disusun oleh:

Reynaldi Suryajaya

MBK2324010465

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 21 Agustus 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
NIK. 210113160

Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes
NIK. 210101059

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
NIK. 210113160

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa proposal 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 belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 29 Agustus 2025



Reynaldi Suryajaya



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Reynaldi Suryajaya
Tempat / tanggal lahir : Semarang, 14 september 1994
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

TK Aisyiah 01 Kendal : Lulus tahun 2000
SDN 2 Pegulon Kendal : Lulus tahun 2006
SMP Semesta Bilingual Boarding School : Lulus tahun 2009
SMAN 3 Semarang : Lulus tahun 2012
S1 Pendidikan Dokter FK UNISSULA : Lulus tahun 2018
Profesi Dokter FK UNISSULA : Lulus tahun 2021
Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : (2024 – sekarang)

C. Riwayat Keluarga

Nama Ayah : H. Gunawan
Nama Ibu : Hj. Indri Nugrohasuti

D. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter umum di *Stem Cell Cancer and Research Semarang*

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kehadiran Tuhan atas berkat-nya, sehingga proposal tesis dengan judul **“Pengaruh Farmakologi Kombinasi Injeksi Intradermal Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) dan Minoxidil Topikal Terhadap Kadar IGF-1 Dan MDA** (Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Jantan Galur Wistar Model *Alopecia like*)” ini dapat terselesaikan. Proposal tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terimakasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH.,M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan seluruh wakil Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang serta selaku dosen pembimbing I yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proses tesis ini.
4. Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini lebih baik.
5. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak

ilmu yang bermanfaat.

6. Segenap staff SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*) : kalian sudah seperti keluarga kedua saya.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.



Semarang, 29 Agustus 2025
Penulis,

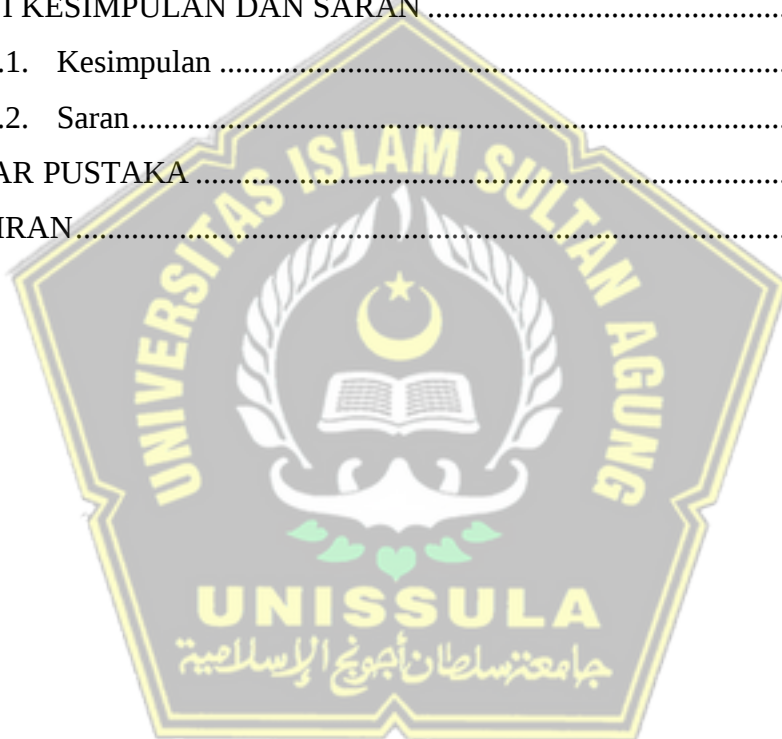
Reynaldi Suryajaya

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENSAHAN	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN.....	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
1.5. Originalitas Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1. Alopecia	10
2.2. Insulin-like growth factor-1 (<i>IGF-1</i>)	12
2.3. <i>Malondialdehyde</i> (MDA)	13
2.4. Hypoxia Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells derived Secretome (<i>SH- MSCs</i>).....	14
2.5. Minoxidil	15

2.6. Pengaruh Kombinasi Injeksi Intradermal SH-MSCs dan Minoxidil Topikal Terhadap Kadar IGF-1 dan MDA.....	17
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	20
3.1. Kerangka Teori.....	20
3.2. Kerangka Konsep.....	22
3.3. Hipotesis Mayor.....	23
BAB IV METODE PENELITIAN.....	24
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	24
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	25
4.2.1. Variabel Penelitian.....	25
4.2.2. Definisi Operasional.....	25
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	27
4.3.1. Subyek penelitian	27
4.3.2. Sampel Penelitian.....	27
4.4. Besar Sampel	28
4.5. Alat dan Bahan	28
4.5.1. Alat Penelitian	28
4.5.2. Bahan Penelitian.....	29
4.6. Cara Penelitian	30
4.6.1. Ethical clearance.....	30
4.6.2. Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	30
4.6.3. Proses Hipoksia.....	31
4.6.4. Pembuatan SH-MSCs	32
4.6.5. Pembuatan alopecia dan pemberian perlakuan pada subjek percobaan.....	32
4.6.6. Metode Validasi.....	33
4.6.7. Terminasi dan Koleksi Kulit	35
4.6.8. Preparasi Jaringan dan Analisis ELISA.....	36
4.7. Alur Penelitian	38
4.8. Analisis Data	39

4.9. Tempat dan Waktu Penelitian	40
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
5.1. Hasil Penelitian	41
5.1.1. Validasi <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>	41
5.1.2. Validasi Tikus Model <i>Alopecia-like</i>	43
5.1.3. Kadar IGF-1	46
5.1.4. Kadar MDA.....	51
5.2. Pembahasan.....	53
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	62
6.1. Kesimpulan	62
6.2. Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	70



DAFTAR SINGKATAN

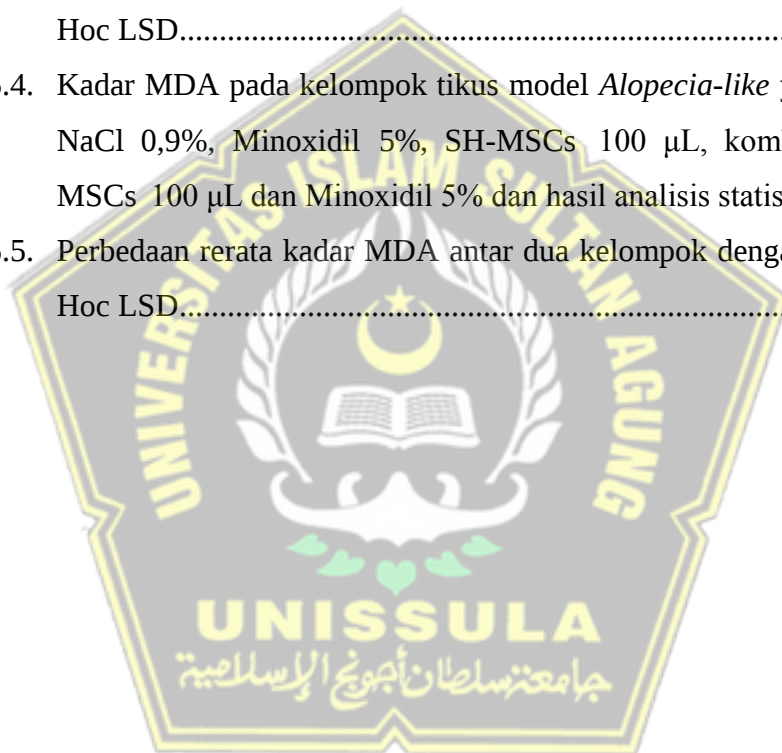
AA	: <i>Alopecia Areata</i>
ADSC-CM	: <i>Adipose-Derived Stem Cell-Conditioned Media</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
BM-MSCs	: <i>Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CM	: <i>Conditioned Media</i>
DHT	: <i>Dihydrotestosteron</i>
DPC	: <i>Dermal Papilla Cell</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FGF-7	: <i>Fibroblast Growth Factor-7</i>
GAG	: <i>Glikosaminoglikan</i>
H&E	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HFEC	: <i>Hair Follicle Epithelial Cells</i>
HF-MSC	: <i>Hair Follicle-Mesenchymal Stem Cell</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IGF-1R	: <i>Type-I IGF Receptor</i>
IGFBP-1	: <i>Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1</i>
IGFBP-2	: <i>Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-2</i>
IL-1 α	: <i>Interleukin-1-alpha</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IP	: <i>Immune Privilege</i>
JAK	: <i>Janus Kinase</i>
LSD	: <i>Fisher's Least Significant Difference</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
M-CSF	: <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MDA	: <i>Malondialdehida</i>
MHC	: <i>Major Histocompatiblity Complex</i>

miRNA	: <i>microRNA</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NaCl	: <i>Natrium Chloride</i>
NKG2D	: <i>Natural Killer Group 2, member D</i>
PD-ECGF	: <i>Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factors</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PI-3K	: <i>Phosphoinositide- 3-Kinase</i>
P-SCs	: <i>Placenta-Derived Stem Cell</i>
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SH-MSC	: <i>Secretome Hypoxia-Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
URJ	: <i>Unit Rawat Jalan</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	7
Tabel 5.1. Kandungan Sitokin dan <i>Growth Factor</i> pada SH-MSCs.....	43
Tabel 5.2. Kadar IGF-1 pada kelompok tikus model <i>Alopecia-like</i> yang diberi NaCl 0,9%, Minoxidil 5%, SH-MSCs 100 µL, kombinasi SH-MSCs 100 µL dan Minoxidil 5% dan hasil analisis statistik.....	48
Tabel 5.3. Perbedaan rerata kadar IGF-1 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc LSD.....	50
Tabel 5.4. Kadar MDA pada kelompok tikus model <i>Alopecia-like</i> yang diberi NaCl 0,9%, Minoxidil 5%, SH-MSCs 100 µL, kombinasi SH-MSCs 100 µL dan Minoxidil 5% dan hasil analisis statistik.....	51
Tabel 5.5. Perbedaan rerata kadar MDA antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc LSD.....	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Faktor yang mempengaruhi ketidakseimbangan fase anagen dan katagen pada rambut.....	11
Gambar 2.2.	Komponen <i>secretome</i> MSC.....	15
Gambar 2.3.	Rantai Kimia Minoxidil	16
Gambar 2.4.	Imunopatogenesis Alopecia. Folikel rambut menyajikan autoantigen pada MHC ke sel T CD8 ⁺ dan CD4 ⁺ , yang berinteraksi dengan sel imun lainnya sebagai respons terhadap sinyal inflamasi yang dilepaskan.....	18
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	22
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep Penelitian.....	22
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian.....	24
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	38
Gambar 5.1.	Validasi MSCs.....	41
Gambar 5.2.	(A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) kondrosit setelah pemberian pewarnaan <i>Alizarin Red</i> dan <i>Alcian Blue</i> pada perbesaran 200x (ditunjukkan dengan panah hitam). ...	42
Gambar 5.3.	Validasi Tikus Model <i>Alopecia-like</i>	44
Gambar 5.4.	Validasi Histopatologi Jaringan Kulit Tikus..	45
Gambar 5.5.	Kadar IGF-1 pada Jaringan Kulit Tikus Model <i>Alopecia-like</i> pada setiap kelompok.	50
Gambar 5.6.	Kadar MDA pada Jaringan Kulit Tikus Model <i>Alopecia-like</i> pada setiap kelompok.	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Statistik.....	70
Lampiran 2. CoA Secretome SCCR.....	74
Lampiran 3. Surat Keterangan Selesai Penelitian.....	75
Lampiran 4. Foto Kegiatan Penelitian	78
Lampiran 5. <i>Ethical Clearance</i>	80



ABSTRAK

Alopecia (kebotakan) merupakan suatu kondisi yang ditandai dengan kerontokan rambut yang berlebih. Alopecia like atau areata disebabkan oleh sistem imun yang menyerang folikel rambut terutama pada kulit kepala. Terapi standar yang telah digunakan belum dapat mengobati alopecia secara efektif dan memiliki efek samping, sehingga diperlukan terapi *adjuvant* seperti penggunaan terapi hypoxia umbilical cord mesenchymal stem cell derived secretome (SH-MSCs).

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) dan minoxidil topikal terhadap kadar IGF-1 dan MDA pada tikus jantan galur wistar model alopecia like.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental *in vivo* dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group*. Objek penelitian yang digunakan yaitu 28 ekor tikus jantan galur wistar yang kemudian dibagi menjadi 4 kelompok yaitu K1: Tikus model Alopecia-like diinjeksi NaCl 0.9%, K2: Tikus model Alopecia-like diberi Minoxidil 5% secara topikal, K3: Tikus model Alopecia-like diinjeksi SH-MSCs 100 µL, K4: Tikus model Alopecia-like yang diberi injeksi SH-MSCs 100 µL dan Minoxidil 5% secara topikal.

Kadar IGF-1 dan MDA pada kulit tikus dianalisis menggunakan metode ELISA. Hasil menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs dikombinasikan dengan minoxidil 5% topikal secara signifikan meningkatkan kadar IGF-1 dan menurunkan kadar MDA.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi injeksi intradermal SH-MSCs 100µL dan minoxidil 5% topikal secara signifikan meningkatkan kadar IGF-1 dan menurunkan kadar MDA pada tikus jantan galur wistar model alopecia-like, sehingga SH-MSCs dapat digunakan sebagai terapi *adjuvant alopecia*.

Kata kunci: alopecia, SH-MSCs, minoxidil, IGF-1, MDA

ABSTRACT

Alopecia is a condition characterized by excessive hair loss. Alopecia-like or areata results from immune-mediated attack on hair follicles, particularly on the scalp. Current standard therapies remain limited in efficacy and often cause adverse effects, underscoring the need for adjuvant approaches such as hypoxia umbilical cord mesenchymal stem cell-derived secretome (SH-MSCs).

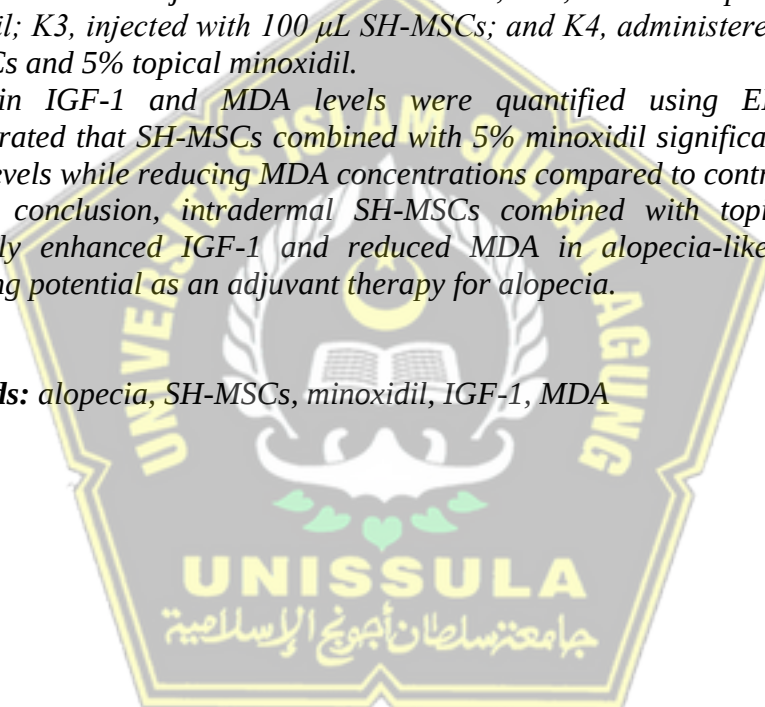
This study evaluated the effect of combined intradermal SH-MSCs and topical minoxidil on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and malondialdehyde (MDA) levels in a Wistar rat model of alopecia-like.

An in vivo experimental design with Randomized Post-Test Only Control Group was employed using 28 male Wistar rats, allocated into four groups: K1, alopecia-like rats injected with 0.9% NaCl; K2, treated topically with 5% minoxidil; K3, injected with 100 μ L SH-MSCs; and K4, administered both 100 μ L SH-MSCs and 5% topical minoxidil.

Skin IGF-1 and MDA levels were quantified using ELISA. Results demonstrated that SH-MSCs combined with 5% minoxidil significantly increased IGF-1 levels while reducing MDA concentrations compared to controls.

In conclusion, intradermal SH-MSCs combined with topical minoxidil effectively enhanced IGF-1 and reduced MDA in alopecia-like Wistar rats, indicating potential as an adjuvant therapy for alopecia.

Keywords: alopecia, SH-MSCs, minoxidil, IGF-1, MDA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alopecia (kebotakan) merupakan suatu kondisi yang ditandai dengan kerontokan rambut secara berlebihan. Kondisi ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor, termasuk faktor genetik, perubahan hormonal, penyakit autoimun, gangguan metabolik atau endokrin, penyakit sistemik lainnya, serta proses penuaan. Alopecia *like* atau areata disebabkan oleh sistem imun yang menyerang folikel rambut terutama pada kulit kepala.¹ Alopecia *like* diklasifikasikan menjadi totalis, universalis, difus dan ofiasis.² Etiopatogenesis alopecia beberapa penelitian menunjukkan peran inflamasi dan radikal bebas menjadi hal esensial dalam patomekanisme alopecia.³⁻⁵ Kortikosteroid dan minoxidil menjadi terapi lini pertama pada alopecia saat ini, namun pemberiannya secara terapi tersebut menunjukkan *insufficiency* terhadap prognosis alopecia⁶. Sebuah studi pada tahun 2023 melaporkan bahwa 42,6% pasien dengan *alopecia areata patchy* mengalami pertumbuhan rambut penuh, sementara 48,5% mengalami kekambuhan setelah pengobatan tersebut, sehingga dibutuhkan terapi *adjuvant* lain untuk meningkatkan prognosis yang lebih baik. Salah satunya *hypoxia umbilical cord mesenchymal stem cell derived secretome* (SH-MSCs).⁷⁻⁹

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa vesikel ekstraseluler yang berasal dari MSC tali pusat manusia meningkatkan kadar IGF-1 dan

mengaktifkan jalur sinyal Nrf2/HO-1, yang berkontribusi pada perbaikan fungsi ovarium pada model tikus dengan ovarium prematur.¹⁰ Sisi lain, secretome MSC juga memiliki efek antioksidan yang dibuktikan dari menurunnya kadar MDA, produk akhir dari peroksidasi lipid yang diinduksi oleh stres oksidatif pada *chronic wound fibroblasts*.¹¹

Folikel rambut merupakan area kaya imunoproteksi disebut juga *immune privilege* (IP) seperti *insulin-like growth factor-1* (IGF-1).^{4,10} Pada alopecia, terjadi insuffisiensi IGF-1 yang menyebabkan gangguan pada fase katagen ditandai dengan infiltrasi sel imun yang berlebihan pada antigen folikel rambut.^{3,5} Hal ini menyebabkan autoantigen folikular dengan infiltrasi limfosit T dan makrofag pada sekeliling folikel rambut.^{5,10} Sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan dari proses ini menstimulasi aktivitas rantai transpor elektron pada mitokondria intraseluler sehingga terjadi peningkatan akumulasi ROS. Akumulasi ROS ini menyebabkan kerusakan lipid membran yang ditandai dengan peningkatan kadar malondialdehid (MDA).^{4,11} Peningkatan MDA berperan dalam meningkatkan antigen folikel rambut sehingga menginduksi terjadinya cedera bahkan kematian sel folikel rambut.⁴ Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa rendahnya IGF-1 dan peningkatan ROS (termasuk MDA) dapat menghambat pertumbuhan rambut, serta IGF-1 sangat berperan dalam mendukung proliferasi sel dermal papilla dan pemanjangan fase anagen pada folikel rambut.¹²⁻¹⁵

Penggunaan minoxidil 5% sebagai monoterapi kurang direkomendasikan pada beberapa kasus alopecia berat, seperti alopecia

totalis atau universalis.¹⁶ Di sisi lain, SH-MSCs menjadi pilihan terapi non-steroid dan non-agresif terhadap kasus alopecia.¹¹ SH-MSCs diyakini memiliki banyak kandungan faktor pertumbuhan seperti IGF-1 dan dapat memberikan proteksi terhadap radikal bebas sehingga dapat meningkatkan regenerasi folikel rambut.^{11,12} Meskipun studi kombinasi spesifik SH-MSCs dan minoxidil masih terbatas, penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan terapi kombinasi antara faktor pertumbuhan stem cell dan minoxidil mempercepat regenerasi rambut dibandingkan monoterapi. Secretome dari mesenchymal stem cells (MSCs), khususnya dalam kondisi hipoksia (SH-MSCs), diketahui mengandung berbagai faktor pertumbuhan seperti IGF-1, VEGF, HGF, dan antioksidan endogen yang lebih tinggi dibandingkan kondisi normoksia¹⁵. Penelitian lain memformulasikan secretome yang mengandung IGF-1 dalam sediaan topikal *hair serum* menunjukkan hasil peningkatan densitas rambut dan laju pertumbuhan rambut secara signifikan setelah 24 minggu penggunaan.¹⁷ Penelitian Kombinasi ini berpotensi sinergis, karena minoksidil meningkatkan permeabilitas dan vaskularisasi lokal yang dapat mempercepat penetrasi dan aktivitas faktor-faktor aktif dari SH-MSCs.

Cara kerja Minoxidil dan SH-MSC tersebut dinilai sinergis dalam kasus alopecia. Potensi terapeutik SHMSC dalam mencegah atau memperbaiki kerontokan rambut, digunakan model alopecia-like yang diinduksi dengan *fluconazole*. Fluconazole menginduksi alopecia pada model hewan dengan menghambat enzim lanosterol 14 α -demethylase (CYP51), yang berperan

penting dalam jalur biosintesis sterol, sehingga menyebabkan defisiensi sterol, disfungsi membran sel dan stres seluler, yang memicu produksi ROS, aktivasi respons inflamasi serta kerusakan folikel rambut. Model ini meniru aspek penting dari patofisiologi alopecia, seperti kerusakan folikel, inflamasi, stres oksidatif, dan penurunan sekresi faktor pertumbuhan.¹³ Namun, belum ada penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi terapi SH-MSCs injeksi dengan minoxidil topikal terhadap kadar IGF-1 dan MDA pada tikus jantan galur Wistar dengan *alopecia like*. Berdasarkan uraian tersebut, peneliti berminat untuk mempelajari lebih lanjut hal tersebut.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh kombinasi injeksi intradermal SH-MSCs dan minoxidil topikal terhadap kadar IGF-1 dan kadar MDA pada tikus jantan galur wistar model *alopecia like*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk membuktikan pengaruh kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) dan minoxidil topikal terhadap kadar IGF-1 dan MDA pada tikus jantan galur wistar model *alopecia like*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) 100µL dan

minoxidil 5% topikal terhadap kadar IGF-1 pada tikus jantan galur wistar model *alopecia like* dibandingkan dengan kelompok control minoxidil 5% topikal.

2. Membuktikan pengaruh kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) 100µL dan minoxidil 5% topikal terhadap kadar MDA pada tikus jantan galur wistar model *alopecia like* dibandingkan dengan kelompok control minoxidil 5% topikal.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) dan minoxidil topikal terhadap kadar IGF-1 dan MDA pada tikus jantan galur wistar model *alopecia like*.

1.4.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat membuktikan pengaruh kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) dan minoxidil topikal terhadap kadar IGF-1 dan MDA pada tikus jantan galur wistar model *alopecia like*. Penelitian ini memiliki manfaat praktis sebagai riset translasi dengan memberikan dasar ilmiah bagi pengembangan terapi kombinasi antara injeksi intradermal SH-MSCs dan minoxidil topikal pada alopecia. Analisis

kadar IGF-1 dan MDA dapat menjadi indikator molekuler untuk mengevaluasi efektivitas dan mekanisme kerja terapi, sekaligus membuka peluang pemanfaatannya sebagai biomarker klinis. Hasil ini diharapkan dapat menjadi pijakan menuju uji klinis awal, mendukung inovasi terapi regeneratif yang lebih efektif, serta memperluas alternatif pengobatan bagi pasien dengan respon terbatas terhadap terapi standar.



1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Deng, W., Zhang, Y., Wang, W. et al. Stem Cell Res Ther 12, 548 (2021). ¹⁸	<i>Hair follicle-derived mesenchymal stem cells decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce Inflammation around the hair follicle.</i>	Experimental in vivo	HF-MSC mendorong proliferasi folikel rambut dan mengurangi peradangan terlihat dari berkurangnya sel T CD8+ pada folikel rambut yang diberikan HF-MSC. Selain itu, pada model tikus C3H/HeJ, injeksi HF-MSC dapat menekan potensi terjadinya alopecia dan mengembalikan imunoprotektif pada folikel rambut.
2	Tang, L., Cao, L., Sundberg, J. P., Lui, H., & Shapiro, J. (2004). <i>Experimental Dermatology</i> , 13(1), 5-10. ¹⁹	<i>Restoration of hair growth in mice with an alopecia areata-like disease using tropical anthralin.</i>	Experimental in vivo	Anthralin adalah reagen terapi yang menjanjikan untuk model hewan pengerat dengan alopecia areata. Anthralin dapat menekan TNF- α /b yang bertanggung jawab atas efek terapeutik anthralin pada model tikus alopecia areata.
3	Legiawati L, Suseno LS, Sitohang IBS, Yusharyahya SN. Et al. K. Stem Cell Res Ther. 2023 Aug 21;14(1):210 ²⁰	<i>Combination of adipose-derived stem cell conditioned media and minoxidil for hair regrowth in male androgenetic alopecia; a randomized, double-blind clinical trial.</i>	Experimental in vivo	Penggunaan ADSC-CM yang dikombinasikan dengan minoxidil selama 6 minggu secara signifikan meningkatkan hampir semua parameter rambut pada semua kelompok perlakuan. Tidak ada efek samping topical atau sistemik yang parah terkait penggunaan ADSC-CM untuk pertumbuhan rambut pada manusia. Penulis meyakini bahwa pengaplikasian langsung ADSC-CM pada kulit kepala dapat menjadi agen yang potensial

4	Park, B.-S., Kim, W.-S., Choi, J.-S., Kim H.-K., Won, J.-H., Ohkubo, F., & Fukuoka, H.(2010). <i>Biomedical Research</i> , 31(1),27-34. ²¹	<i>Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia; evidence of increased growth factor secretion.</i>	Experimental in vivo	ADSC-CM dapat menstimulasi pertumbuhan rambut, dampak ini makin meningkatkan dengan kondisi hipoksia. Sekresi faktor pertumbuhan yang terlihat yaitu IGFBP-1, IGFBP-2, M-CSF, PDGF dan VEGH
5	Pawan KG, Samatha B, Suresh K, et al. (2023). <i>Journal of Cosmetics, Dermatologi cal Sciences and Applications</i> ,13,182-208. ¹⁷	<i>Therapeutic Approach for Hair Growth and Regeneration Using Bioactive Formulation Containing Mesenchymal Stromal Cell-Derived Conditioned Medium.</i>	Experimental in vivo and in vitro	Pengaplikasikan <i>conditioned media</i> (CM) berbasis larutan Trichosera langsung ke kulit kepala terbukti aman dan berkhasiat untuk pengobatan alopecia dan juga dapat digunakan sebagai terapi tambahan dengan pengobatan konvensional yang sudah ada seperti menggunakan finasteride atau minoxidil untuk alopecia.

Penelitian sebelumnya banyak melaporkan mengenai terapi *secretome* yang berasal dari sel punca pada kasus alopecia, namun belum banyak yang meneliti terkait terapi *secretome* yang berasal dari *umbilic cord mesenchymal stem cell* terutama yang dikondisikan dalam keadaan hipoksia. Penelitian yang dilakukan di Jepang, menunjukkan kondisi hipoksia dapat meningkatkan stimulasi faktor pertumbuhan yang bermanfaat bagi pertumbuhan rambut.¹⁶ Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa *secretome* yang berasal dari sel punca aman dikombinasikan dengan terapi konvensional alopecia lain seperti minoxidil dan finasteride, bahkan dapat menunjukkan pertumbuhan rambut yang lebih memuaskan dibandingkan dengan pemberian monoterapi.^{13,22} Sehingga pada tabel 1 diatas, didapatkan

bahwa belum terdapat penelitian yang mempelajari mengenai pengaruh kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) dan minoxidil topikal terhadap kadar IGF-1 dan MDA pada tikus jantan galur wistar model alopecia like. antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.



BAB II

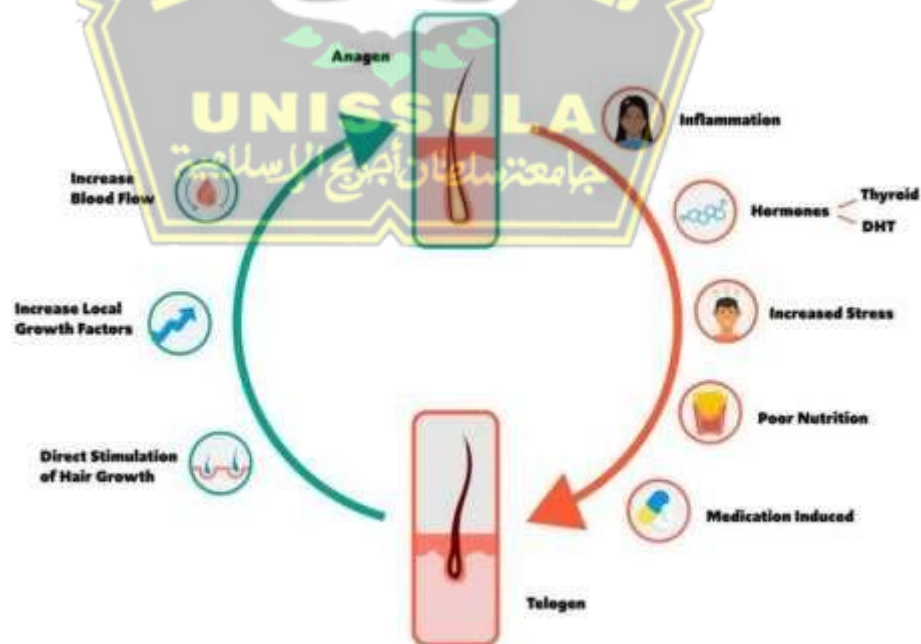
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alopecia

Alopecia adalah jenis kerontokan rambut yang umum, dimana terjadi peradangan, dan tidak menimbulkan jaringan parut.⁵ Alopecia areata termasuk golongan penyakit autoimun diperantarai oleh sel limfosit T yang menyebabkan proses peradangan pada folikel rambut sehingga mengakibatkan gambaran klinis kehilangan rambut secara tiba-tiba dengan membentuk pola sirkular.¹⁰ Kehilangan rambut ini bersifat kronis dan berulang serta umumnya, pasien tidak menunjukkan gejala, meskipun kesemutan, gatal, dan disestesia adalah hal wajar yang dilaporkan sebelum rambut rontok.^{5,10}

Folikel rambut adalah kunci utama perputaran siklus rambut melalui berbagai tahap proliferasi (anagen), involusi (katagen), dan istirahat (telogen), dengan regenerasi rambut.²³ Sekitar 100 helai rambut rontok setiap hari, namun jumlah ini jauh lebih tinggi pada alopecia karena adanya gangguan pada fase anagen.²⁴ Fase anagen merupakan fase terlama yang dapat bertahan dua hingga delapan tahun sebelum beralih ke fase katagen.^{16,23} Pada kasus alopecia terjadi ketidakseimbangan antara fase anagen dan katagen yakni ketika fase anagen bertahan lebih singkat dan fase katagen dimulai dari awal karena beberapa faktor seperti inflamasi, hormon, stress, nutrisi dan efek samping obat.^{16,23}

Inflamasi dapat terjadi apabila terdapat paparan eksternal yang menyebabkan cedera (misalnya tekanan mental, kemoterapi, gaya rambut ketat), namun sebagian besar kasus melibatkan aspek autoimun atau peradangan sehingga terjadi kerusakan pada IP folikel rambut seperti IGF-1 yang menyebabkan sel-sel inflamasi menyerang bulbus rambut sehingga terjadi peningkatan aktivitas MHC kelas I dan MHC kelas II.^{23–25} Hormon telah terbukti mempengaruhi siklus rambut dan memediasi pertumbuhan rambut, termasuk hormon tiroid, dihidrotestosteron (DHT), estrogen, dan testosteron.^{16,24} Stress melalui kortisol dapat mendorong transisi anagen ke telogen sehingga mempengaruhi regulasi siklus siklus rambut. Faktor risiko lainnya yaitu komponen nutrisi telah dievaluasi pengaruhnya terhadap struktur dan pertumbuhan rambut, termasuk berbagai vitamin dan mineral, selain asam lemak dan protein.^{16,24}



Gambar 2.1. Faktor yang mempengaruhi ketidakseimbangan fase anagen dan katagen pada rambut¹⁶

2.2. *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)*

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) merupakan bagian dari *immune privilege* (IP) pada folikel rambut yang telah terbukti berpengaruh pada proliferasi folikel, *remodeling* jaringan, diferensiasi siklus folikel dengan mempertahankan tahap anagen, serta faktor pertumbuhan rambut sebagai pengatur utama proses mitogenik dan morfogenetik pada perkembangan folikel rambut berdasarkan ekspresinya pada papila rambut dermal.^{20,26} Pada siklus rambut, IGF-1 berfungsi untuk memperpanjang fase anagen dan mencegah fase katagen.³ IGF-1 diketahui diatur oleh hormon androgen.²⁷ IGF-1 diproduksi oleh sel mesenkim papila dermal dan bertindak secara parakrin dan autokrin dengan mengikat *type I IGF receptor* (IGF-1R).¹⁸ Untuk mengekspresikan efek biologisnya, IGF-1 perlu berikatan dengan reseptor permukaan sel tertentu yaitu IGF-1R.¹⁹ Pengikatan ini mengaktifkan jalur *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase* MAPK/ERK dan *phosphoinositide 3-kinase* (PI-3K) yang memicu respons hilir dan akhirnya merangsang pembelahan sel.^{18,19}

IGF-1 juga berperan sebagai immunomodulator dengan cara menekan ekspresi *major histocompatibility complex I* (MHC I) sehingga proses presentasi autoantigen ke sel T CD8+ autoreaktif dapat dicegah serta menekan presentasi self-antigen melalui inhibisi *transporter associated with antigen processing* (TAP).²⁰ Suatu studi menunjukkan ekspresi *growth hormone* (GH) dan nutrisi dapat mempengaruhi IGF-1 pada level sistemik dengan memediasi kerja endokrin GH tetapi efek ini tidak berpengaruh pada jaringan perifer seperti kulit atau folikel rambut.²¹ Sehingga peningkatan IGF- 1 lebih bermakna untuk alopecia jika diekspresikan secara lokal pada

folikel rambut.

2.3. *Malondialdehyde (MDA)*

Stres oksidatif didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas, dikenal sebagai pengganggu jalur sinyal molekuler dan aktivitas enzim yang berlanjut pada kerusakan jaringan.¹⁷ *Reactive oxygen species (ROS)* adalah molekul efektor utama dari stres oksidatif, yang diproduksi dalam keadaan fisiologis, seperti selama metabolisme sel, dan dalam kondisi patologis.²⁸ Sumber ROS endogen meliputi mitokondria, membran plasma, retikulum endoplasma, dan peroksisom, sedangkan sumber eksogen, seperti paparan sinar UV, stres kronis, olahraga intens, infeksi, alergen dan polutan.^{17,28}

Malondialdehyde (MDA) berperan sebagai indikator tidak langsung dari ROS yang merupakan penanda tingkat kerusakan membran plasma akibat aksi radikal bebas.²⁹ MDA adalah salah satu produk akhir peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda yang terletak di membran sel lalu prosesnya berlanjut dengan reaksi rantai radikal.²⁹ Kulit termasuk kulit kepala adalah penjaga utama antara lingkungan dan tubuh. Kulit kepala terus-menerus terkena berbagai pengaruh fisik, kimia, dan paparan sinar UV sehingga paling berdampak langsung oleh ROS.³⁰

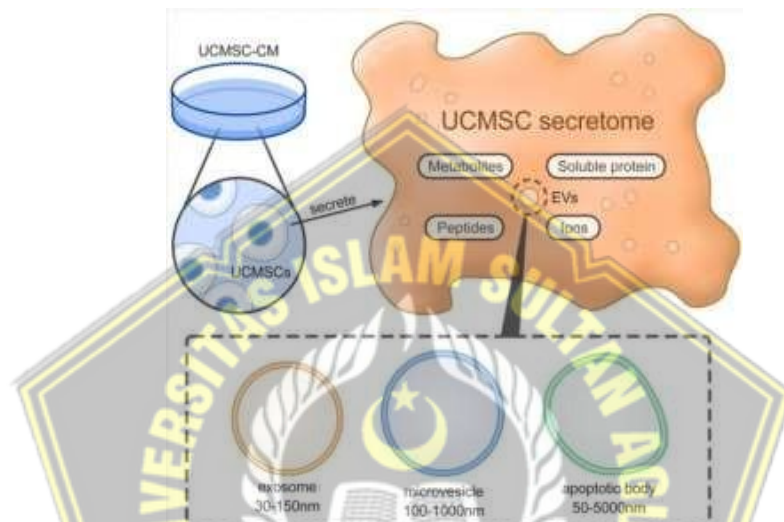
Pada kasus alopecia, terjadi keretakan IP yang mengakibatkan terjadinya auto-antibodi dan pelepasan sitokin proinflamasi.^{5,10} Sitokin proinflamasi seperti IFN- γ , IL-1 β , dan IL-6 dikenal sebagai pemicu stres oksidatif yang mengakibatkan reaksi rantai radikal bebas sehingga membuat

kulit memproduksi lipid, protein, DNA, dan radikal bebas lainnya termasuk MDA.³⁰ MDA mencetuskan kaskade autoimun dengan meningkatkan apoptosis dan formasi autoantibodi yang dapat meningkatkan produksi sitokin inflamasi.³⁰ Proses auto-antibodi dan stres oksidatif seperti MDA berinteraksi satu sama lain untuk mendorong perkembangan peradangan folikel rambut.^{30,31} Peningkatan radikal bebas menyebabkan peningkatan kadar MDA, suatu studi menunjukkan kadar MDA pada pasien dengan alopecia secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan orang sehat.³²

2.4. Hypoxia Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells derived Secretome (SH- MSCs)

MSC mengeluarkan berbagai molekul bioaktif, termasuk protein, asam nukleat, proteasome, eksosom, microRNA dan vesikel membran, yang secara kolektif dikenal sebagai *secretome*, sebagai respons terhadap lingkungan sekitar seperti dalam lingkungan hipoksia.^{12,33} Istilah hipoksia dalam konteks kultur sel merujuk pada tekanan oksigen yang berkisar antara 0 hingga 10%.^{16,33} Kondisi kultur hipoksia berguna untuk mengkondisikan MSC dalam meningkatkan kapasitasnya dalam bertahan hidup dalam jangka waktu yang lebih lama, meningkatkan laju proliferasi, dan mempertahankan MSC dalam keadaan yang tidak terdiferensiasi.³³ Studi yang dilakukan pada tikus menunjukkan bahwa SH-MSC mengandung jumlah molekul anti-inflamasi yang lebih tinggi daripada *secretome* MSC normosik. Dalam kondisi hipoksia, MSC menunjukkan peningkatan ekspresi molekul anti-inflamasi dan faktor pertumbuhan.³⁴ Fenomena ini

disebabkan oleh stres terkontrol yang disebabkan oleh kekurangan oksigen, kemudian kondisi ini mempengaruhi aktivasi berbagai jalur yang bergantung pada hipoksia, termasuk HIF-1a dan STAT-3.^{33,34} Di sisi lain, *secretome* MSC normosik dan hipoksia memiliki kadar TNF- α yang rendah.^{33,35}



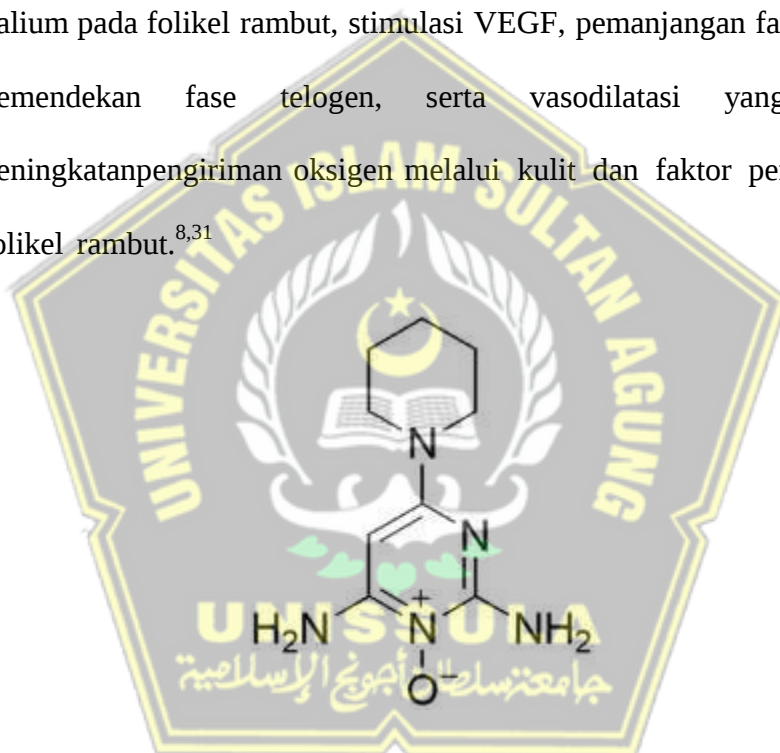
Gambar 2.2. Komponen *secretome* MSC.³⁶

SH-MSC secara sinergis dapat meningkatkan regenerasi folikel rambut dengan cara mempengaruhi sel-sel di sekitarnya dan mengatur berbagai proses biologis melalui faktor pertumbuhan, sitokin, dan protein lainnya.^{11,12} SH-MSC terdiri dari VEGF, IGF, dan sitokin anti-inflamasi lainnya yang sangat terkait dengan regenerasi rambut.³⁷ Regenerasi rambut melibatkan papilla derma yang terdapat pada dasar folikel rambut, SH-MSC menginduksi bagian ini melalui berbagai mekanisme seperti JAK-STAT.^{37,38}

2.5. Minoxidil

Minoxidil adalah antihipertensi yang telah tersedia dalam formulasi topikal dan disetujui untuk pengobatan alopecia sejak tahun 1990an.⁸

minoxidil merupakan senyawa 2,4-pyrimidinediamine,6-(1-piperidinyl)-, 3-oxide yang tersedia dalam bentuk busa dan larutan yang mengandung alkohol dan propilen glikol berperan dalam penyerapan ke dalam jaringan.³¹ Formulasi minoxidil yang ada saat ini sebanyak 2% untuk wanita dan 5% untuk pria dengan penggunaan topikal sebanyak dua kali sehari.³¹ Beberapa mekanisme kerja pada alopecia telah dipelajari termasuk aktivasi kanal kalium pada folikel rambut, stimulasi VEGF, pemanjangan fase anagen dan pemendekan fase telogen, serta vasodilatasi yang menyebabkan peningkatan pengiriman oksigen melalui kulit dan faktor pertumbuhan ke folikel rambut.^{8,31}



Gambar 2.3. Rantai Kimia Minoxidil

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kombinasi terapi *secretome* MSC dengan minoxidil terbukti aman, bahkan *secretome* MSC dapat mengurangi efek samping kerontokan pada awal penggunaan minoxidil.¹³ *Secretome* MSC dan minoxidil bekerja secara agonis dengan hubungan timbal balik *secretome* MSC dan minoxidil yang saling meningkatkan stimulasi faktor pertumbuhan pada sel papilla dermal untuk

regenerasi rambut.^{4,13}

2.6. Pengaruh Kombinasi Injeksi Intradermal SH-MSCs dan Minoxidil Topikal Terhadap Kadar IGF-1 dan MDA

Folikel rambut yang terkena alopecia mengalami peradangan karena peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan dari stress oksidatif dan aktivasi sel T.²⁴ Faktor perangsang stress oksidatif seperti MDA dapat menginduksi kemotaksis berbagai sel inflamasi di sekitar epitel folikel rambut tepatnya area bulbus tempat sel-sel papila dermal berdiferensiasi.^{4,24} Penyebab autoimun ini dikarenakan adanya kelemahan dari IP salah satunya IGF-1.^{18,25} Saat IP melemah, sel-sel folikel rambut melepaskan sitokin dan kemokin melalui peningkatan ekspresi MHC dan ligand sel NK NKG2D + yang selanjutnya terjadi rekrutmen sel T CD4+ oleh CXCR3 yang memicu pelepasan lebih lanjut perforin dan granzim sitotoksik dan mengakibatkan apoptosis sel folikel rambut.^{25,30}

Sel T yang aktif memproduksi IFN- γ menjadi mediator utama dengan meningkatkan regulasi IL-15 dan kemokin inflamasi (CXCL9/10/11) di folikel rambut melalui jalur JAK-STAT.^{25,30} Kemudian, IL-15 kembali berikatan dengan sel T CD8 + NKG2D + untuk menghasilkan lebih banyak IFN- γ , membentuk umpan balik yang menyebabkan kerusakan IP folikel rambut meningkat dan mendorong serangan autoimun pada folikel rambut oleh sel-sel inflamasi, seperti seperti sel dendritik, sel T , sel NK, sel mast dan sel makrofag.^{24,25,30} Sel-sel ini dikenal sebagai sumber endogen untuk MDA sebagai respons terhadap inflamasi.⁴ Selain itu, *tumour necrosis*

Gambar 2.4. Imunopatogenesis Alopecia. Folikel rambut menyajikan autoantigen pada MHC ke sel T CD8+ dan CD4+, yang berinteraksi dengan sel imun lainnya sebagai respons terhadap sinyal inflamasi yang dilepaskan.²⁵

SH-MSC dan minoxidil bekerja secaraagonis untuk menekan inflamasi dan regenerasi rambut. SH-MSC dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang menurunkan stres oksidatif pada fibroblas dan menyembuhkan luka seperti tukak diabetes yang dirusak oleh stres oksidatif seluler.³⁹ Selain itu, studi menunjukkan dampak menguntungkan bahwa SH-MSC pada sel kulit diyakini memediasi faktor pertumbuhan seperti IGF-1.^{12,33} SH-MSC juga dapat berperan sebagai imunomodulasi dengan regulasi dari jalur pensinyalan JAK- STAT.¹⁶ Hal ini menjadi dasar mekanisme SH-MSC dalam mengurangi kerontokanditunjangdengankombinasi minoxidil topikal

sebagai terapi utama karena minoxidil dapat membantu stimulasi faktor pertumbuhan dari SH-MSC seperti IGF-1, VEGF serta *platelet-derived endothelial cell growth factor* (PD- ECGF) sehingga terjadi proliferasi papila dermal.⁴⁰



BAB III

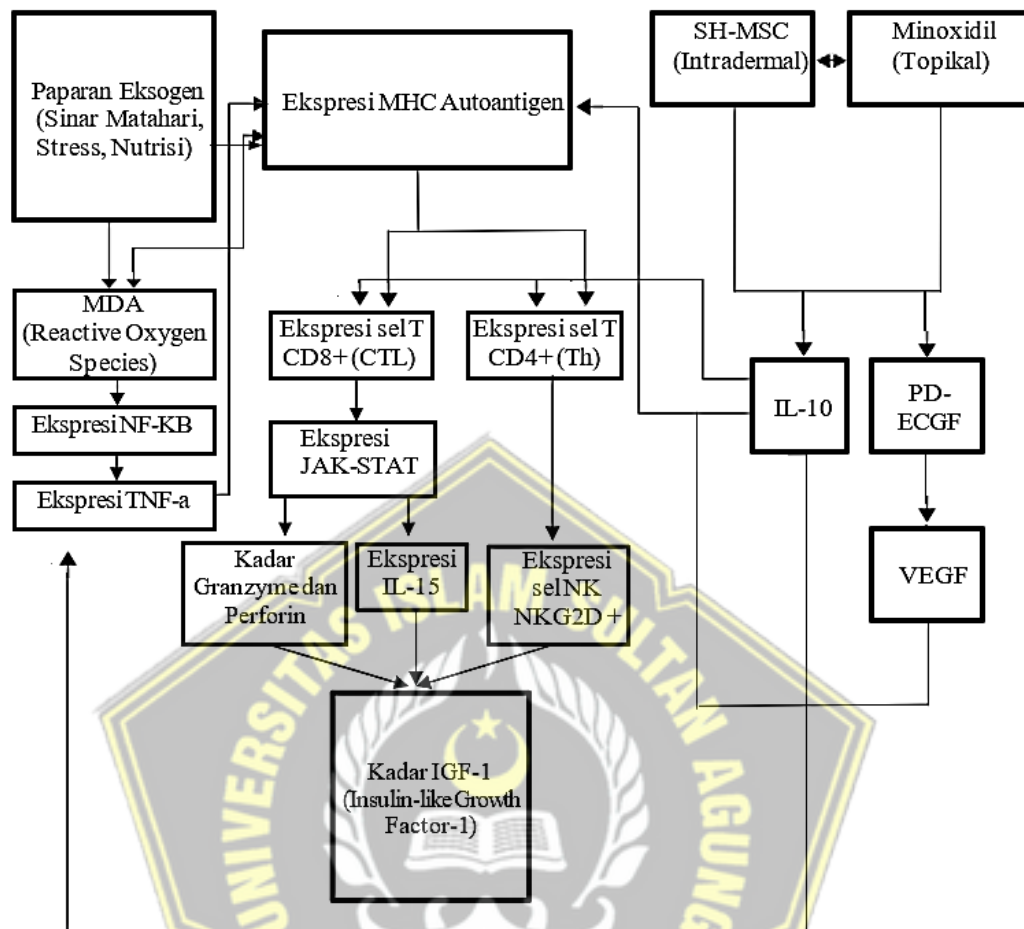
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Alopecia dapat terjadi karena paparan dari luar (eksogen) maupun dari dalam (endogen), diantara faktor penyebabnya yaitu : genetik, epigenetik, fisik, emosional, sosial, serta faktor lingkungan juga dapat dipengaruhi dari respon autoimun akibat *immune privilege collapse* (IP) salah satunya menurunnya IGF-1.^{3,10} Paparan dari luar menyebabkan terjadinya stress oksidatif sehingga radikal bebas meningkat. Studi menunjukkan radikal bebas seperti MDA yang terdeteksi menjadi etiologi intrinsik spesifik yang berperan dalam etiopatogenesis alopecia dan dapat meningkatkan inflamasi serta kerentanan IP.^{4,36} Telah disepakati bahwa alopecia adalah penyakit autoimun pada folikel rambut sebagai respons terhadap auto-antigen folikel dengan infiltrasi *perifollicular* pada limfosit T dan makrofag.^{4,24} Sel-sel turut menjadi sumber endogen yang meningkatkan MDA sebagai respons inflamasi.⁴ Penurunan IGF-1 secara timbal balik mengakibatkan terjadinya auto-antigen melibatkan ekspresi MHC I dan MHC II sehingga meningkatkan ekspresi sel T CD8⁺ dan CD4⁺ pada folikel rambut. Sitokin dan kemokin inflamasi yang dihasilkan oleh sel T ini bekerja pada sel folikel rambut, menyebabkan pelepasan lebih banyak sitokin dan kemokin pro-inflamasi yang selanjutnya merekrut sel NKG2D⁺ oleh CD4⁺ dan pelepasan IL-15 oleh CD8⁺ melalui jalur JAK-STAT untuk

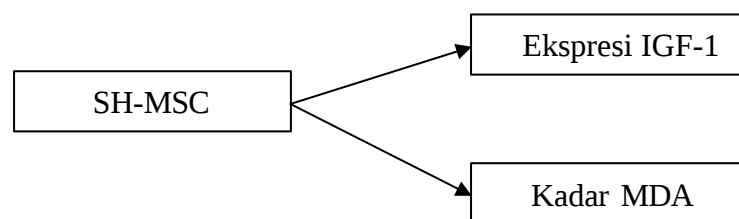
menghasilkan *granzyme* sitotoksik dan *perforin* kemudian terjadi apoptosis folikel rambut.

SH-MSC menunjukkan jumlah IL-10 yang lebih tinggi dibandingkan dengan *secretome* MSC normosik. IL-10 mempunyai efek anti inflamasi dan mampu menekan aktivitas proinflamasi auto-atigen dengan cara bertindak sebagai *immunomodulator* langsung pada sel T untuk merangsang polarisasi makrofag M1 pro-inflamasi ke M2 anti-inflamasi.³⁴ Selain itu, SH-MSC juga bertindak sebagai JAK-STAT inhibitor sehingga sehingga dapat menekan pelepasan sitokin dan kemokin proinflamasi serta mengurangi produksi spesies oksigen reaktif (ROS) seperti MDA. Dengan penurunan kadar MDA, stres oksidatif dapat dikendalikan dan proses inflamasi yang menyebabkan kerusakan folikel rambut ditekan.^{16,39} SH-MSC mengandung berbagai macam faktor pertumbuhan seperti IGF-1 yang penting dalam pemulihan "*immune privilege*" di folikel rambut. Kombinasi SH-MSC dengan minoxidil topikal dapat menstimulasi pelepasan IGF-1 lebih tinggi, yang berperan memperbaiki lingkungan imun di sekitar folikel rambut dan mendorong fase anagen pertumbuhan rambut.^{4,37} Faktor pertumbuhan lain yang turut terlibat dan penting yaitu PD-ECGF. PD-ECGF meningkatkan *angiogenesis* dengan stimulasi VEGF untuk merangsang pertumbuhan rambut.⁴ Dengan demikian, kombinasi SH-MSC dan minoxidil bekerja sinergis menekan inflamasi, stres oksidatif, dan meningkatkan *angiogenesis* serta ekspresi faktor pertumbuhan penting dalam regenerasi rambut pada model alopecia.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep Penelitian

3.3. Hipotesis Mayor

Terdapat peningkatan ekspresi IGF-1 dan penurunan kadar MDA setelah diberikan perlakuan kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) dan minoxidil topikal pada tikus jantan galur wistar model *alopecia like* dibanding kelompok kontrol.

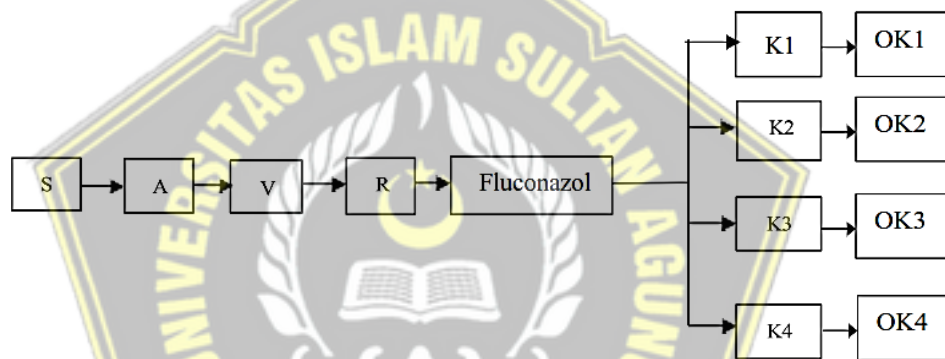


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan eksperimental *in vivo* dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group*. Objek penelitian adalah tikus jantan galur wistar yang dinyatakan layak oleh dokter hewan. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok dengan rincian sebagai berikut:



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Tikus Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi alokasi

Kelompok KN : K1: Kontrol Negatif (Tikus induksi fluconazole model *Alopecia Like* dengan pemberian NaCL 0.9%)

Kelompok KP : K2: Kontrol Positif (Tikus induksi fluconazole model *Alopecia Like* dengan pemberian Minoxidil 5%)

Kelompok 1 : K3: Tikus induksi fluconazole model *Alopecia Like* pemberian injeksi SH-MSCs 100 μ L

Kelompok 2 : K4: Tikus induksi fluconazole model *Alopecia Like* pemberian injeksi SH-MSCs 100 μ L + Minoxidil 5%

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah SH-MSCs dan minoxidil

4.2.1.2. Variabel Prakondisi

Tikus yang diinduksi *fluconazole* 35 mg/kgBB per oral selama 14 hari menggunakan sonde untuk membuat model *Alopecia Like*.

4.2.1.3. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah peningkatan kadar IGF-1 dan penurunan kadar MDA

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. *Secretome Hypoxia Derived Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs)*

SH-MSCs mengacu pada faktor terlarut yang disintesis oleh sel punca dan digunakan untuk komunikasi antar sel. Kandungan SH-MSCs termasuk protein, vesikel ekstraseluler (EV), dan asam nukleat. SH-MSCs menyumbang beragam protein serum, faktor pertumbuhan, faktor angiogenik, hormon, sitokin, protein matriks ekstraseluler, protease matriks ekstraseluler, dan bahkan, dalam jumlah rendah, mediator lipid dan materi genetik.

Skala: Rasio

4.2.2.2. Kadar IGF-1

Kadar IGF-1 yang diperiksa dengan metode ELISA pada papilla dermal memiliki peran penting dalam kontrol siklus rambut serta diferensiasi batang rambut selama perkembangan folikel rambut. IGF-1 telah dilaporkan mendorong pertumbuhan folikel rambut secara *in vitro* dengan mengatur proliferasi sel. Dengan tidak adanya IGF-1, folikel rambut anagen dalam kultur organ memasuki katagen.

Skala: Rasio

4.2.2.3. Kadar MDA

Kadar MDA yang diperiksa dengan metode ELISA adalah produk akhir dari reaksi peroksidasi yang disebabkan oleh ROS yang bekerja pada lipid. MDA merupakan produk utama oksidasi lipid dan berperan sebagai penanda penting. Diketahui kadar MDA dalam plasma dan biopsi kulit kepala pasien alopecia jauh lebih tinggi dibandingkan pada subjek sehat.

Skala: Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek penelitian

Tikus jantan galur Wistar berusia 6-8 minggu dengan berat badan 200-250 gram digunakan sebagai subjek penelitian setelah dinyatakan sehat oleh dokter hewan dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia. Hewan percobaan tersebut dipelihara dalam kondisi laboratorium yang sesuai standar, dengan ventilasi udara yang baik dan suhu ruangan dijaga antara 20-28°C. Selama masa pemeliharaan, tikus diberi pakan pelet standar dan air minum bersih secara *ad libitum*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

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

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang sakit, luka, cidera atau infeksi selama masa penelitian.
- b. Tikus yang tidak menunjukkan gejala alopecia setelah diberikan induksi

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

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

4.4. Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan besaran sampel dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

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

$$3 (n - 1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan rumus tersebut, penelitian ini menggunakan enam ekor sampel pada setiap kelompok dengan menambahkan 1 ekor sampel untuk risiko mortalitas pada tikus selama penelitian menjadi total 7 ekor per perlakuan sehingga didapatkan jumlah total sampel yang digunakan sebanyak 28 ekor.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam kultur MSC dan isolasi SH-MSC antara lain:

1. BSC
2. CO2 inkubator
3. Sentrifuge

4. uPulse tangential flow filtration
5. membran filtrasi TFF (Tangential Flow Filtration) 100 kda dan 500 kda
6. Flowcytometer
7. mikroskop inverted
8. incubator biasa
9. mikropipet
10. tabung sentrifuge
11. flask kultur sel
12. botol beher
13. hypoxia chamber
14. pH meter
15. *autoclave*
16. lampu UV.

4.5.2. Bahan Penelitian

Bahan yang dipakai dalam penelitian meliputi bahan kultur yang terdiri dari:

1. DMEM
2. Fetal Bovine Serum
3. Phospat Buffer Saline
4. Antibiotik dan anti jamur
5. Flask kultur
6. sentrifuge tube

7. pipet tip.
8. NaCl, dan Aquabidest
9. alkohol 70%
10. kapas steril
11. ketamin
12. xylazine
13. vial tube
14. pisau bisturi
15. Elisa Kit

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. Ethical clearance

Ethical clearance penelitian diajukan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang.

4.6.2. Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

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

- a. Setelah dikumpulkan, *umbilical cord* dimasukkan ke dalam wadah steril yang diberi NaCl 0,9%
- b. Dengan menggunakan pinset, masukkan *umbilical cord* ke dalam cawan petri dan gunakan PBS untuk membersihkannya secara menyeluruh
- c. *Umbilical cord* janin tikus dipotong dan pembuluh darahnya

dibuang

- d. Setelah *umbilical cord* dicincang halus, diletakkan secara merata di dalam labu 25T dan diamkan selama tiga menit agar tisu menempel pada permukaan labu
- e. Media (DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan sedikit demi sedikit hingga jaringan tertutup
- f. Eksplan disimpan dalam inkubator dengan 5% CO₂ pada suhu 37°C
- g. Setelah prosedur kultur dimulai, sel akan berkembang setelah sekitar 14 hari
- h. Setiap tiga hari, media diganti dengan cara membuang setengahnya dan menambahkan yang baru dan penuh sebagai gantinya
- i. Pemeliharaan sel berlanjut hingga 80% sel konfluensi.

4.6.3. Proses Hipoksia

- a. MSCs dengan konfluensi 80% dimasukkan, dan ditambahkan hingga 10 mL media penuh
- b. Selanjutnya *flask* yang mengandung MSCs ditempatkan dalam *hypoxia chamber*
- 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
- g. Isolasi dilakukan dengan metode TFF untuk menghasilkan SH-MSCs.

4.6.4. Pembuatan SH-MSCs

SH-MSCs 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 SH-MSCs menggunakan *flowcytometri* dengan penanda permukaan berupa CD81, CD63, dan CD9. Hasil yang telah tervalidasi mengandung SH-MSCs disimpan dalam tabung 2,5 mL dan disimpan dalam suhu 2-8 °C.

4.6.5. Pembuatan alopecia dan pemberian perlakuan pada subjek percobaan

- a) Seluruh prosedur penelitian disetujui oleh komite etik hewan.
- b) Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylasine (20mg/kgbb).
- c) Rambut pada bagian punggung tikus potong hingga bersih.

- d) Tikus kelompok S tidak di berikan treatmen apapun. Tikus kelompok KN, P1 dan P2 diberikan *fluconazole* 35 mg/kgBB per oral selama 14 hari menggunakan sonde.
- e) Hari ke-15 dilakukan validasi
- f) Dilakukan injeksi Subkutan pada punggung tikus. Injeksi NaCL dilakukan pada KN, injeksi SH-MSCS dosis 100µl/kgbb pada P1, dan Injeksi SH-MSCs dosis 100µl/kgbb dan minoxidil topikal 5% pada kelompok P2.
- g) Hari ke-29 dilakukan validasi dan pemeriksaan sampel
- h) Jaringan yang telah dihomogenisasi disimpan dalam -80°C hingga proses analisis.

4.6.6. Metode Validasi

Validasi mikroskopis dengan preparat histologi menggunakan pewarnaan *Hematoksilin-Eosin* (HE). Alopecia ditandai jika tidak ditemukan folikel dalam fase anagen pada kulit tikus. Untuk melakukan validasi mikroskopis dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:

- a) Sampel kulit diperoleh dari masing-masing kelompok dan diawetkan dalam larutan NBF 10% atau *Neutral Buffer Formalin*
- b) Sampel kulit dibilas dari larutan fiksatif dengan alkohol 70% sampai bersih
- c) Sampel ditandai dan ditempatkan dalam keranjang tisu setelah difiksasi dalam larutan BNF 10

- d) Alkohol absolut dan alkohol 70, 80%, 90%, dan 96% digunakan untuk mendehidrasi sampel jaringan masing-masing selama 30 menit
- e) Sampel dimasukkan ke dalam toluol selama satu jam, atau hingga menjadi bening atau transparan
- f) Infiltrasi ke dalam parafin dilakukan di dalam oven pada suhu 56 -60°C dengan cara memasukkan sampel kulit ke dalam campuran toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Sampel kulit dimasukkan ke dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III masing-masing perlakuan selama 30 menit.
- g) Kemudian sampel ditanam (*embedding*) dalam parafin dan *blocking* ditunggu hingga paraffin mengeras
- h) Dengan menggunakan mikrotom, potong blok jaringan menjadi irisan berukuran 6 µm. Kemudian letakkan potongan-potongan tersebut di atas permukaan kaca yang telah dilapisi perekat *Mayer Albumin*, ditetesi sedikit air suling, dan dipanaskan di atas *hot plate* hingga menempel sempurna
- i) Sebelum pewarnaan jaringan, parafin dihilangkan (*deparaffinisasi*) dengan xylol selama sehari penuh atau 24 jam
- j) Dilakukan dengan pewarna hematoksin-eosin. Kandungan xylol diserap dengan kertas saring, kemudian berturut-turut dimasukkan ke alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%,

30%, dan akuades masing-masing dilakukan selama 1-2 menit. Preparat dimasukkan ke dalam pewarna Hematoksilin selama 5-10 detik, lalu dibilas dengan air mengalir selama 10 menit. Proses selanjutnya preparat dicelupkan ke dalam alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70% masing-masing selama 3-5 menit. Preparat dimasukkan ke dalam eosin selama 5 -10 menit, kemudian dicelupkan ke alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96% masing-masing selama 3-5 menit, lalu dikeringkan dengan kertassaring. Preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 15 menit, kemudian sediaan histologis ditetesi canada balsam.

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

4.6.7. Terminasi dan Koleksi Kulit

- a) Isolasi jaringan kulit dilakukan setelah tikus diterminasi melalui prosedur eutanasia, yaitu dengan pemberian kombinasi ketamin dan xylazine (dosis lethal, ketamin 300 mg/kg BB dan xylazine 30 mg/kg BB) secara intraperitoneal.
- b) Letakkan tikus di atas permukaan steril.
- c) Bersihkan area kulit yang akan diambil dengan etanol povidon iodine
- d) Gunakan biopsy punch untuk mendapatkan sampel kulit di area dorsal.
- e) Masukkan sampel ke dalam tabung yang telah berisi PBS dan

snap freeze

menggunakan nitrogen cair

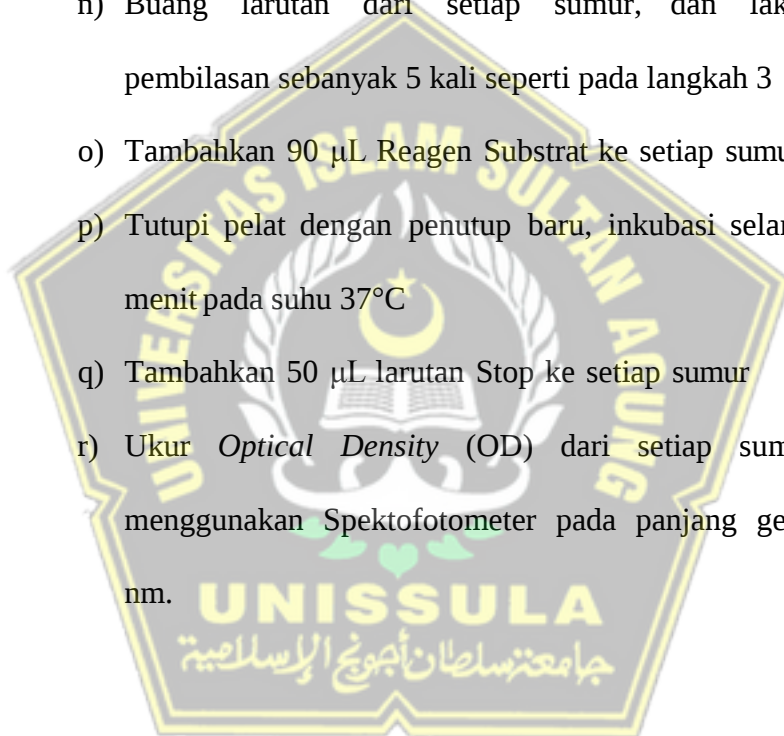
- f) Simpan sampel pada kondisi -80°C

4.6.8. Preparasi Jaringan dan Analisis ELISA

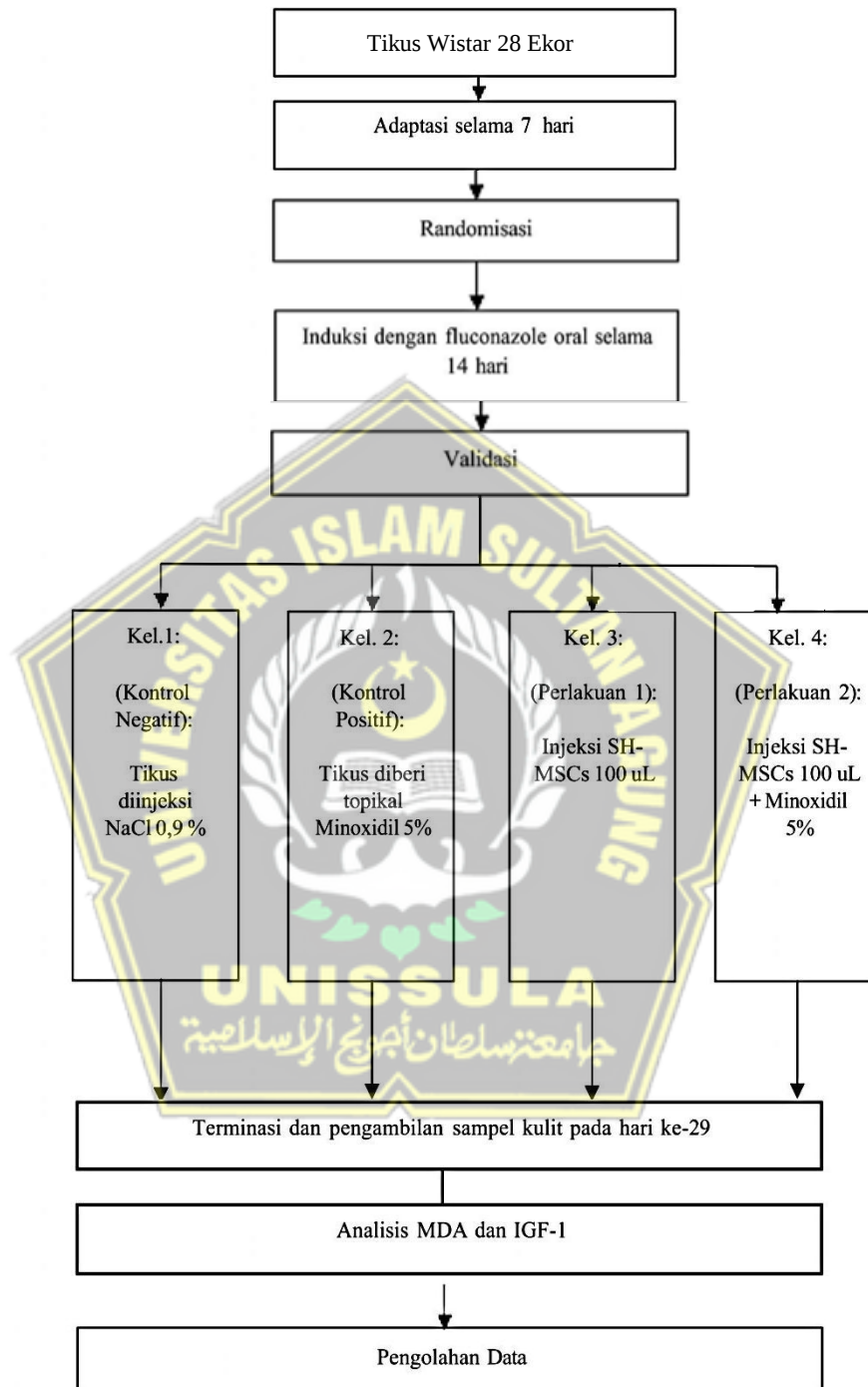
- a) Bilas jaringan dengan PBS dingin untuk menghilangkan kontaminan.
- b) Potong jaringan dalam ukuran kecil dan timbang sebesar 50 mg
- c) Homogenisasi jaringan dalam larutan RIPA buffer
- d) Centrifuge pada 4°C , 12.000 rpm, 10–15 menit dan ambil supernatannya
- e) Tentukan sumuran untuk standar,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

pada suhu 37°C

- k) Lakukan pencucian dengan menambahkan 350 μ L larutan *wash buffer* ke setiap sumur, diulangi sebanyak 3 kali
- l) Tambahkan 100 μ L Konjugat HRP ke setiap sumur
- m) Tutupi pelat dengan penutup baru, inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C
- n) Buang larutan dari setiap sumur, dan lakukan proses pembilasan sebanyak 5 kali seperti pada langkah 3
- o) Tambahkan 90 μ L Reagen Substrat ke setiap sumur
- p) Tutupi pelat dengan penutup baru, inkubasi selama sekitar 15 menit pada suhu 37°C
- q) Tambahkan 50 μ L larutan Stop ke setiap sumur
- r) Ukur *Optical Density* (OD) dari setiap sumur sekaligus menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.



4.7. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.8. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ($p > 0,05$) dan tidak homogen ($p < 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane*. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Jika didapatkan sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 for Windows.

4.9. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*) Semarang, pada bulan Mei-Juli 2025.



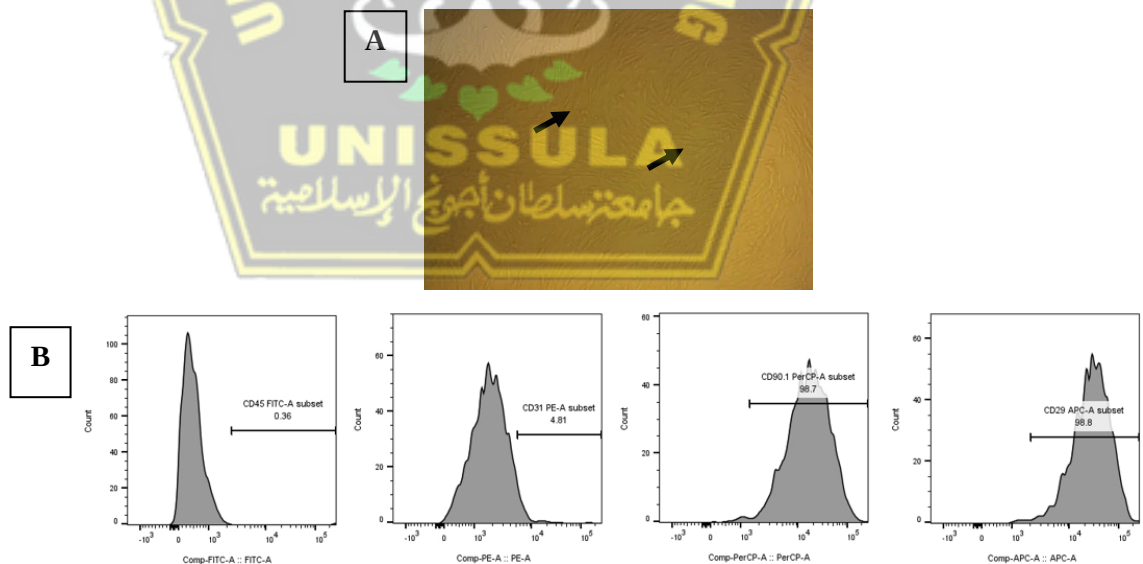
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

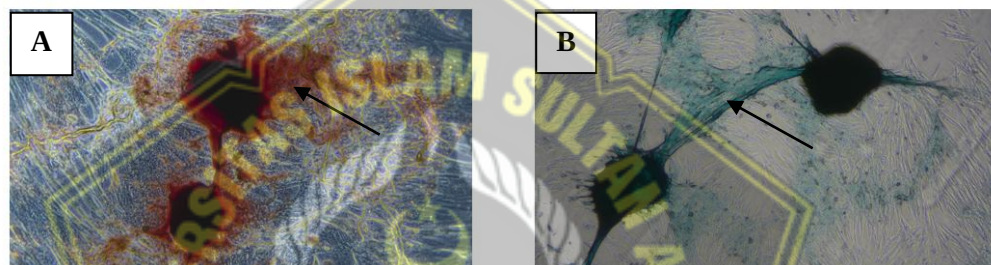
5.1.1. Validasi *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*

Isolasi *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Indonesia, Semarang, menggunakan sumber tali pusat tikus dengan usia 21 hari kehamilan. Sel hasil isolasi kemudian dikultur pada flask T75 dengan medium DMEM komplet. Hasil kultur MSCs yang telah mencapai pasase ke-5 menunjukkan sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* (Gambar 5.1A) saat diamati menggunakan mikroskop.



Gambar 5.1. Validasi MSCs. (A) Morfologi MSCs berbentuk *fibroblast-like* (ditunjuk oleh anak panah) pada perbesaran 100x. (B) Analisis flow cytometry ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31.

Hasil isolasi MSCs divalidasi menggunakan metode *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Hasil analisis menunjukkan bahwa sel yang dikultur mengekspresikan CD90 (98,7%) dan CD29 (98,8%), dan hanya sedikit mengekspresikan CD45 (0,36%) dan CD31 (4,81%) (Gambar 5.1B). Hal ini menunjukkan bahwa sel yang dikultur dari tali pusat tervalidasi sebagai MSCs.



Gambar 5.2. (A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) kondrosit setelah pemberian pewarnaan *Alizarin Red* dan *Alcian Blue* pada perbesaran 200x (ditunjukkan dengan panah hitam).

Sel MSCs dikultur dalam medium induksi osteogenik dan kondrogenik selama 20 hari untuk mengetahui kemampuan diferensiasi menjadi osteosit dan kondrosit. Gambaran diferensiasi osteogenik MSCs ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarin Red* Gambar (5.2A). Diferensiasi kondrogenik MSCs ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi glikosaminoglikan (GAG) dengan pewarnaan *Alcian Blue* (Gambar 5.2B). Deposisi kalsium ditunjukkan dengan warna merah dan GAG ditunjukkan dengan warna biru tua yang merupakan hasil diferensiasi MSCs menjadi osteosit dan kondrosit pada masing-masing kultur.

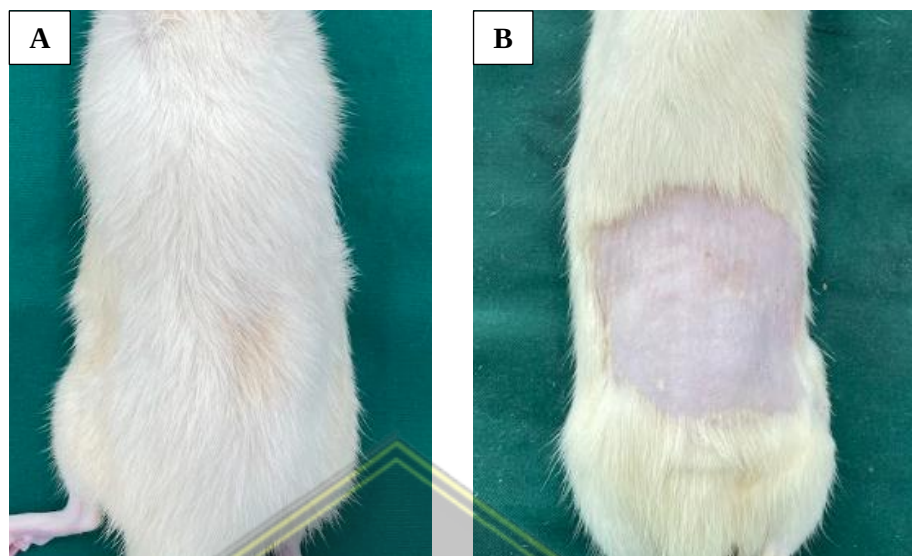
MSCs diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi 5% O₂ selama 24 jam menggunakan *hypoxic chamber*. Medium kultur MSCs yang mengandung sekretom kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF) berdasarkan *molecular weight cut off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 10-50 kDa yang mengandung sitokin dan *growth factor*. SH-MSCs diketahui menghasilkan IL-10 100,29 pg/mL dan VEGF 303,04 pg/mL (Tabel 5.1).

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

Biomolekul	Konsentrasi (pg/mL)
IL-10	100,29
VEGF	303,04

5.1.2. Validasi Tikus Model Alopecia-like

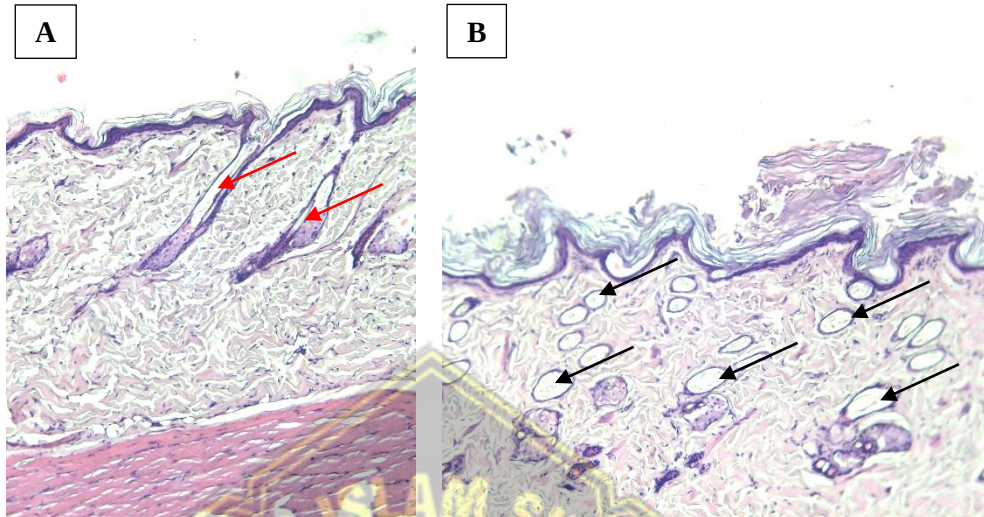
Validasi pembuatan tikus model *Alopecia-like* dilakukan dengan membandingkan kondisi densitas rambut pada tikus sehat dan tikus yang diinduksi *fluconazole*. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tikus sehat memiliki densitas rambut yang lebih padat, sedangkan tikus yang diinduksi *fluconazole* memiliki densitas rambut yang lebih jarang (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. Validasi Tikus Model *Alopecia-like*. (A) Tikus sehat dan (B) Tikus Model *Alopecia-like* yang diinduksi *Fluconazole*.

Analisis histopatologi menggunakan pewarnaan H&E dilakukan untuk memvalidasi tikus telah berhasil menjadi *alopecia* setelah diinduksi menggunakan *fluconazole*. Preparat jaringan kulit tikus sehat menunjukkan bahwa lapisan epidermis tampak utuh, terdiri dari lapisan stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, dan stratum korneum yang kompak. Dermis papiler dan retikuler tersusun baik dengan serabut kolagen teratur dan distribusi fibroblas yang normal. Tidak ditemukan infiltrasi sel radang. Folikel rambut berada pada fase anagen yang dominan, dengan batang rambut utuh dan matriks aktif di bagian bulb. Selubung akar bagian luar dan dalam (outer dan inner root sheath) terlihat lengkap tanpa tanda degenerasi. Tidak ada miniaturisasi folikel atau transisi prematur ke fase telogen. Tampak lapisan jaringan ikat longgar dan

sedikit jaringan adiposa subkutan yang teratur (Gambar 5.4A).



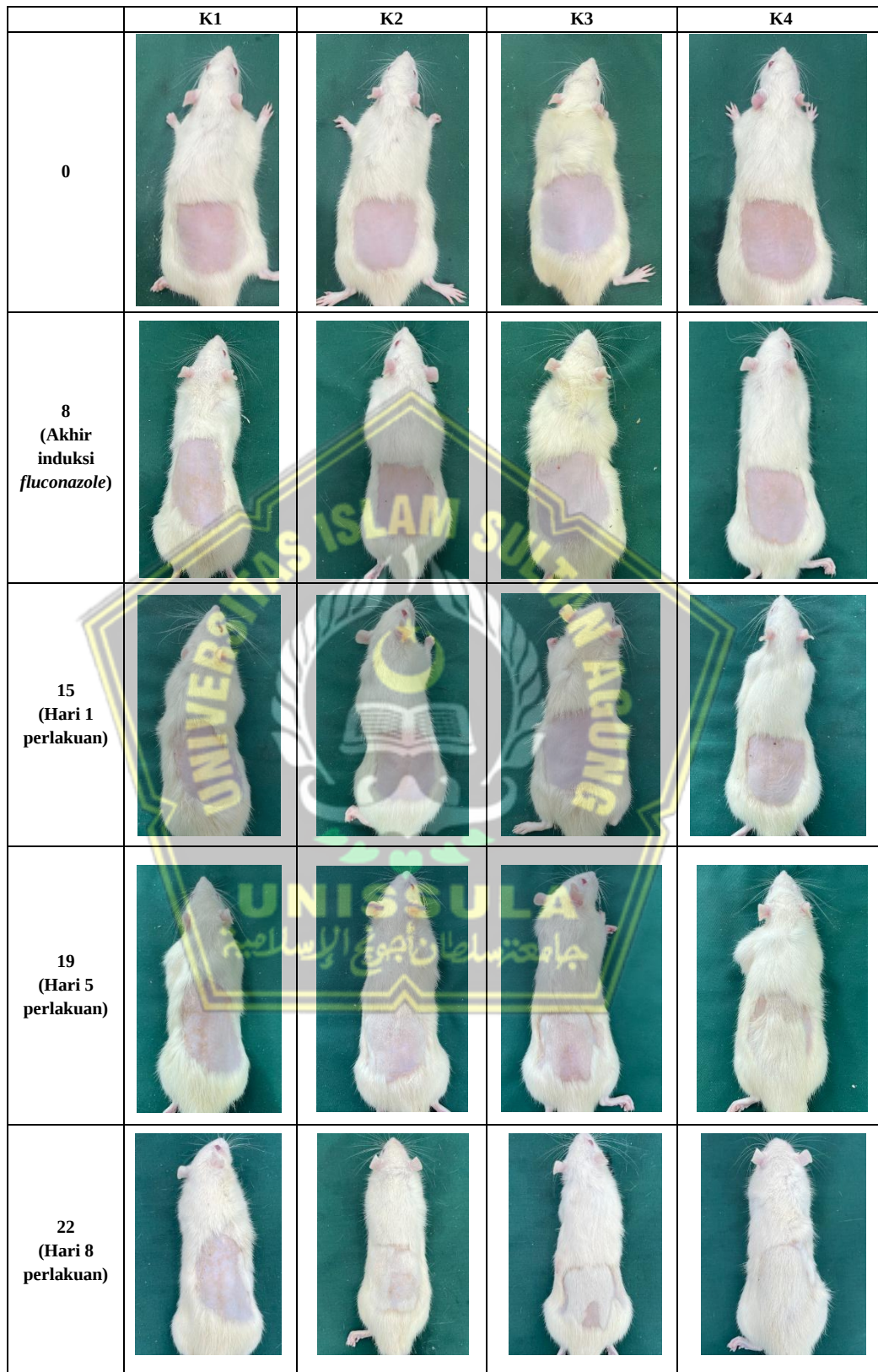
Gambar 5.4. Validasi Histopatologi Jaringan Kulit Tikus. (A) Tikus sehat dan (B) Tikus Model *Alopecia-like* yang diinduksi *Fluconazole*. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (H&E). Perbesaran 100x. Panah merah: folikel anagen, panah hitam: folikel telogen.

Preparat jaringan kulit tikus model *alopecia-like* menunjukkan bahwa lapisan epidermis relatif utuh, namun tampak sedikit hiperkeratosis pada stratum korneum. Folikel rambut mayoritas berada pada fase telogen, ditandai posisi folikel yang lebih superfisial, bulb kecil, dan tidak adanya matriks aktif pembentuk batang rambut. Folikel anagen sangat berkurang; yang ada menunjukkan ukuran lebih kecil dibandingkan kulit sehat dan beberapa mengalami miniaturisasi. Beberapa folikel telogen tampak kosong (tanpa batang rambut), konsisten dengan proses hair shedding pada AA (Gambar 5.4B).

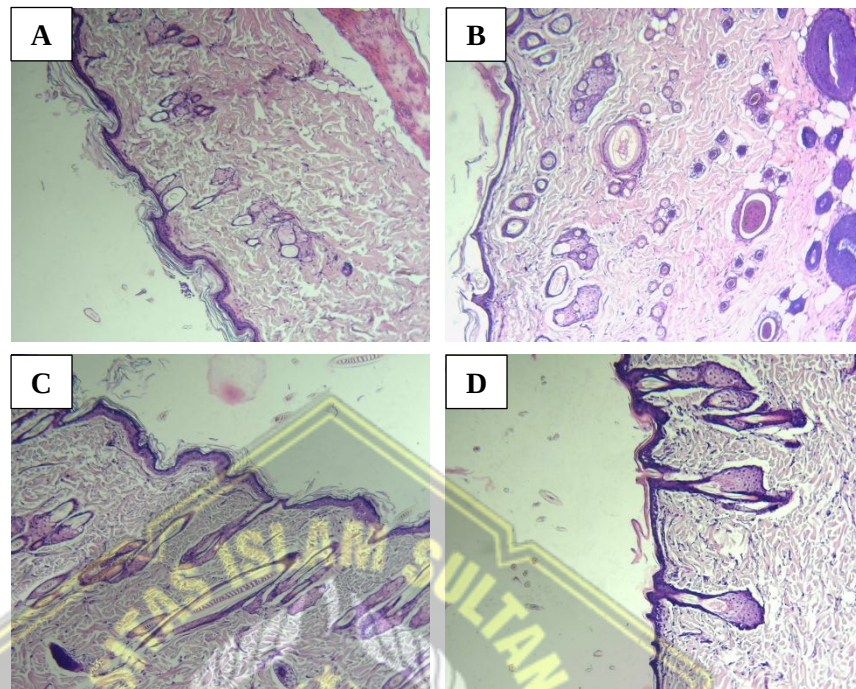
5.1.3. Pertumbuhan Rambut Tikus Model *Alopecia-like*

Pengamatan pertumbuhan rambut tikus pada tiap kelompok diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan pertumbuhan rambut dilakukan pada hari ke-1, 5, dan 8 setelah pemberian injeksi intradermal NaCl (K1), Minoxidil topikal (K2), injeksi SH-MSCs (K3), dan kombinasi injeksi SH-MSCs dan Minoxidil topikal (K4) selama 7 hari. Tikus yang diberi kombinasi injeksi SH-MSCs dan Minoxidil topikal menunjukkan pertumbuhan rambut yang lebih cepat dibandingkan dengan kelompok lainnya (Gambar 5.5).

Pertumbuhan folikel rambut diamati secara histologi. Folikel rambut pada K1 mayoritas berada pada fase telogen, ditandai posisi folikel yang lebih superfisial, bulb berukuran kecil, dan tidak terdapat matriks aktif pembentuk batang rambut (Gambar 5.6A). Folikel rambut pada K2 berada pada fase anagen I yang ditandai dengan ukuran folikel yang lebih besar dibandingkan K1 (Gambar 5.6B). Folikel rambut pada K3 dan K4 berada pada fase anagen III ditunjukkan dengan folikel yang lebih besar dan terletak lebih dalam dibandingkan pada K1 (Gambar 5.6C,D). Dermal papilla pada K4 berukuran lebih besar dibandingkan dengan K3.



Gambar 5.5. Pertumbuhan Rambut Tikus pada Tiap Kelompok.



Gambar 5.6. Histopatologi jaringan kulit tikus pada tiap kelompok setelah pemberian (A) NaCl, (B) Minoxidil 5% Topikal, (C) Injeksi SH-MSCs, dan (D) Injeksi SH-MSCs dan Minoxidil 5% Topikal. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (H&E). Perbesaran 100x.

5.1.4. Kadar IGF-1

Pengukuran kadar IGF-1 dilakukan menggunakan metode ELISA dari jaringan kulit tikus model *alopecia-like* pada hari ke-7 setelah pemberian perlakuan pertama. Hasil rerata kadar IGF-1 dinyatakan dalam satuan pg/mL (Tabel 5.2).

Tabel 5.2. Kadar IGF-1 pada kelompok tikus model *Alopecia-like* yang diberi NaCl 0,9%, Minoxidil 5%, SH-MSCs 100 μ L, kombinasi SH-MSCs 100 μ L dan Minoxidil 5% dan hasil analisis statistik

Variabel	Kelompok				P value
	K1 (pg/mL)	K2 (pg/mL)	K3 (pg/mL)	K4 (pg/mL)	
Kadar IGF-1	4,37 $\pm$ 0,97	6,19 $\pm$ 1,18	7,25 $\pm$ 1,10	11,23 $\pm$ 1,70	
Shapiro-Wilk	0,476	0,054	0,779	0,057	
Levene Test					0,797
One Way Anova					0,000

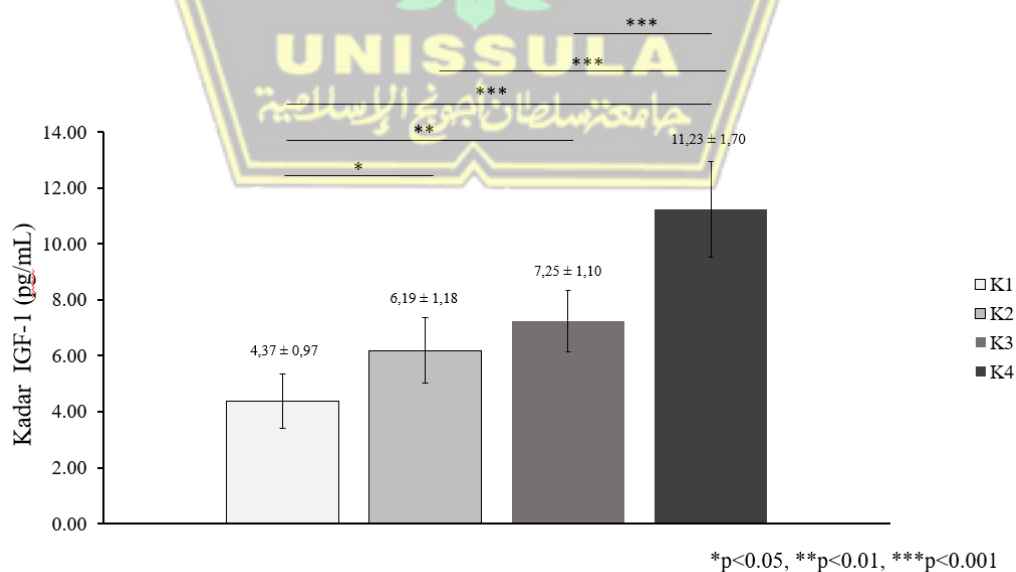
Kelompok K1, yaitu tikus model *alopecia-like* yang diberi injeksi NaCl, menunjukkan kadar IGF-1 terendah, yaitu sebesar $4,37 \pm 0,97$ pg/mL. Kelompok K2, yang mendapatkan perlakuan topikal minoxidil, mengalami peningkatan kadar IGF-1 sebesar $6,19 \pm 1,18$ pg/mL. Terdapat peningkatan kadar IGF-1 pada kelompok K3, yaitu tikus yang diberi injeksi SH-MSCs, dengan kadar IGF-1 sebesar $7,25 \pm 1,10$ pg/mL. Kadar IGF-1 tertinggi ditunjukkan pada kelompok K4, yaitu tikus yang diberi kombinasi injeksi SH-MSCs dan minoxidil topikal, yaitu $11,23 \pm 1,70$ pg/mL.

Uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) sehingga dilakukan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD. Analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) (Tabel 5.2), membuktikan bahwa pemberian SH-MSCs, secara tunggal maupun dikombinasikan dengan minoxidil berpengaruh nyata dalam meningkatkan kadar IGF-1 pada jaringan kulit tikus model *alopecia-like*. Uji Post Hoc LSD dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap kadar IGF-1 antar kelompok (Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Perbedaan rerata kadar IGF-1 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc LSD

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0,037
	K3	0,002
	K4	0,000
K2	K3	0,205
	K4	0,000
K3	K4	0,000

Hasil analisis data menunjukkan bahwa K3 dan K4 berbeda signifikan dibandingkan dengan K1 ($p < 0,05$). K4 berbeda secara signifikan dibandingkan dengan K2 ($p < 0,05$), sedangkan K3 tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan K2 ($p > 0,05$). Data menunjukkan bahwa K3 berbeda secara signifikan dengan kelompok K4 ($p < 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 5.5, rerata kadar IGF-1 tertinggi terdapat pada kelompok K4 dibandingkan dengan K3.



Gambar 5.5. Kadar IGF-1 pada Jaringan Kulit Tikus Model *Alopecia-like* pada setiap kelompok.

5.1.5. Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan menggunakan metode ELISA dari jaringan kulit tikus model *alopecia-like* pada hari ke-7 setelah pemberian perlakuan pertama. Hasil rerata kadar IGF-1 dinyatakan dalam satuan pg/mL (Tabel 5.4).

Tabel 5.4. Kadar MDA pada kelompok tikus model *Alopecia-like* yang diberi NaCl 0,9%, Minoxidil 5%, SH-MSCs 100 μ L, kombinasi SH-MSCs 100 μ L dan Minoxidil 5% dan hasil analisis statistik

Variabel	Kelompok				P value
	K1 (pg/mL)	K2 (pg/mL)	K3 (pg/mL)	K4 (pg/mL)	
Kadar MDA	83,73 $\pm$ 6,48	80,81 $\pm$ 6,77	74,70 $\pm$ 3,29	71,37 $\pm$ 4,65	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,984	0,182	0,429	0,303	
<i>Levene Test</i>					0,184
<i>One Way Anova</i>					0,010

Kelompok K1, yaitu tikus model *alopecia-like* yang diberi injeksi NaCl, menunjukkan kadar MDA tertinggi, yaitu sebesar 83,73 $\pm$ 6,48 pg/mL. Kelompok K2, yang mendapatkan perlakuan topikal minoxidil, mengalami penurunan kadar MDA menjadi 80,81 $\pm$ 6,77 pg/mL. Terdapat penurunan kadar MDA pada kelompok K3, yaitu tikus yang diberi injeksi SH-MSCs, dengan kadar MDA sebesar 74,70 $\pm$ 3,29 pg/mL. Kadar MDA terendah ditunjukkan pada kelompok K4, yaitu tikus yang diberi kombinasi injeksi SH-MSCs dan minoxidil topikal, yaitu 71,37 $\pm$ 4,65 pg/mL.

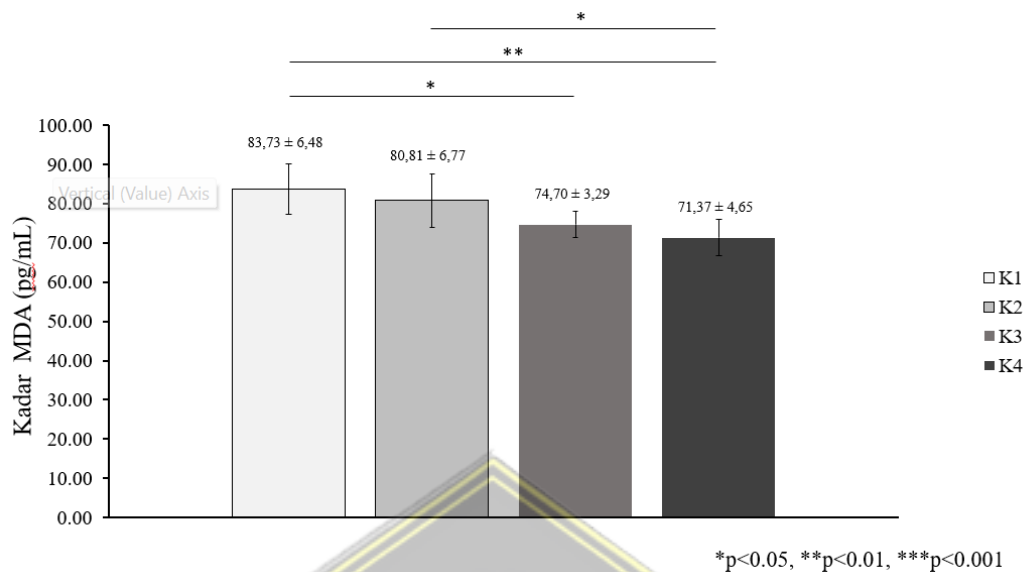
Uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) sehingga dilakukan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD. Analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar

kelompok perlakuan ($p < 0,05$) (Tabel 5.4), membuktikan bahwa pemberian SH-MSCs, secara tunggal maupun dikombinasikan dengan minoxidil berpengaruh nyata dalam menurunkan kadar MDA pada jaringan kulit tikus model *alopecia-like*. Uji Post Hoc LSD dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap kadar MDA antar kelompok (Tabel 5.5).

Tabel 5.5. Perbedaan rerata kadar MDA antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc LSD

Kelompok	Kelompok	Signifikansi
K1	K2	0,412
	K3	0,019
	K4	0,003
K2	K3	0,098
	K4	0,015
K3	K4	0,351

Hasil analisis data menunjukkan bahwa K3 dan K4 berbeda signifikan dibandingkan dengan K1 ($p < 0,05$). K4 berbeda secara signifikan dibandingkan dengan K2 ($p < 0,05$), sedangkan K3 tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan K2 ($p > 0,05$). Data menunjukkan bahwa K3 tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok K4 ($p > 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 5.7, rerata kadar MDA terendah terdapat pada kelompok K4 dibandingkan dengan K3.



Gambar 5.6. Kadar MDA pada Jaringan Kulit Tikus Model *Alopecia-like* pada setiap kelompok.

5.2. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pemberian SH-MSCs secara tunggal dan SH-MSCs dikombinasikan dengan minoxidil topikal terhadap kadar IGF-1 dan MDA pada tikus model *alopecia-like*. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan kadar IGF-1 dan MDA yang signifikan antara kelompok perlakuan.

Kelompok K1 memiliki kadar IGF-1 terendah ($4,37 \pm 0,97$ pg/mL), yang menunjukkan kondisi inflamasi tinggi pada model *alopecia-like* tanpa intervensi. *Fluconazole* menginduksi stres seluler, yang memicu produksi ROS, aktivasi respons inflamasi, serta kerusakan folikel rambut, sehingga mengakibatkan penurunan kadar IGF-1 pada jaringan kulit tikus model *alopecia-like*⁴³. IGF-1 secara fisiologis disekresikan oleh dermal papilla cells dan jaringan sekitar folikel, berfungsi memperpanjang fase anagen

melalui jalur PI3K/AKT, menstimulasi proliferasi keratinosit matriks rambut, dan menekan apoptosis pada sel folikel³¹. Penurunan IGF-1 secara signifikan menyebabkan pemendekan fase anagen, peningkatan apoptosis, dan miniaturisasi folikel yang pada akhirnya menurunkan densitas rambut^{27,29}.

Pemberian minoxidil topikal pada K2 meningkatkan kadar IGF-1 secara signifikan ($6,19 \pm 1,18$ pg/mL) dibandingkan K3. Minoxidil merupakan terapi standar yang direkomendasikan secara luas untuk alopecia karena efektivitasnya dalam memperpanjang fase anagen dan meningkatkan kepadatan rambut⁴¹. Mekanisme kerja minoxidil meliputi beberapa aspek, antara lain menginduksi ekspresi growth factor pada dermal papilla cells seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), dan *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1), yang berperan dalam memperbaiki mikro lingkungan folikel dan mendukung pertumbuhan rambut. Selain itu, minoxidil bekerja sebagai pembuka kanal kalium (*potassium channel opener*) yang menyebabkan hiperpolarisasi membran sel, meningkatkan aliran darah folikel, dan memperbaiki suplai oksigen serta nutrisi ke matriks rambut. Minoxidil juga meningkatkan angiogenesis di sekitar folikel melalui induksi VEGF, sehingga memperkuat efek pertumbuhan rambut yang dimediasi IGF-1^{42,43}. Kombinasi efek ini memungkinkan minoxidil mempertahankan folikel dalam fase anagen lebih lama dan mencegah miniaturisasi folikel yang merupakan ciri khas alopecia.

Injeksi SH-MSCs pada K3 menunjukkan peningkatan kadar IGF-1 yang signifikan ($7,25 \pm 1,10$ pg/mL) dibandingkan kontrol negatif. SH-MSCs mengandung berbagai faktor parakrin seperti IGF-1, VEGF, HGF, IL-10, *Prostaglandin E2* (PGE2), dan eksosom berisi *microRNA* (miRNA). Kondisi hipoksia saat kultur MSCs meningkatkan sekresi faktor pro-angiogenik dan anti-inflamasi, termasuk VEGF dan IL-10, yang selain memperbaiki vaskularisasi juga menggeser fenotipe makrofag dari M1 proinflamasi menjadi M2 anti-inflamasi. Pergeseran ini secara langsung menurunkan produksi TNF- α di jaringan, sehingga mengurangi kerusakan folikel dan memperpanjang fase anagen. Menurut penelitian sebelumnya, pertumbuhan rambut dimediasi oleh faktor parakrin yang disekresikan dalam SH-MSCs. VEGF menginduksi regenerasi rambut dengan memicu vaskularisasi perifolikuler. HGF menstimulasi pertumbuhan folikel dengan menstimulasi ekspresi β -catenin. Sekresi IGF-1 berkaitan dengan migrasi, survival, proliferasi, *tissue remodeling* dan mengatur siklus pertumbuhan folikel rambut, serta PDGF memicu siklus pertumbuhan rambut untuk memasuki fase anagen. SH-MSCs melalui mekanisme yang kompleks akan menginduksi proliferasi dermal papilla cells dengan memodulasi siklus sel melalui *up regulation* cyclin D1 dan CDK2 yang kemudian akan mengaktifasi jalur pensinyalan Erk dan Akt^{44,45}.

Pemberian kombinasi minoxidil topikal dan injeksi SH-MSCs pada K4 menunjukkan peningkatan kadar IGF-1 yang signifikan ($11,23 \pm 1,70$ pg/mL) dibandingkan dengan kontrol dan pemberian injeksi SH-MSCs

secara tunggal. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan yang diberikan menghasilkan efek sinergis. SH-MSCs menyediakan growth factor dan mediator anti-inflamasi seperti IGF-1, VEGF, HGF, IL-10, PGE2, dan eksosom yang memulihkan lingkungan mikro folikel, sedangkan minoxidil memperkuat distribusi nutrisi dan oksigen sekaligus menginduksi ekspresi IGF-1. Sinergi ini tercermin dari kadar IGF-1 yang paling tinggi pada K4, menunjukkan bahwa kombinasi terapi lebih efektif dalam mengatasi defisiensi IGF-1 dan mendukung regenerasi folikel pada kondisi *alopecia*.

Analisis terhadap kadar MDA memperlihatkan pola penurunan yang signifikan pada kelompok perlakuan. Kelompok K1 memiliki kadar MDA tertinggi ($83,73 \pm 6,48$ pg/mL) dibandingkan kelompok lainnya. Peningkatan kadar MDA (malondialdehida) mencerminkan tingginya stres oksidatif dan kerusakan membran sel dalam folikel rambut akibat induksi *fluconazole* pada tikus model *alopecia*-like. Stres oksidatif ini mempercepat transisi fase anagen ke fase telogen serta menurunkan aktivitas dermal papilla cells, yang berkontribusi pada miniaturisasi folikel dan kerontokan rambut. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa MDA merupakan produk akhir dari reaksi peroksidasi yang disebabkan oleh ROS pada lipid. Plasma dan sampel biopsi pasien *alopecia areata* memiliki kadar MDA yang lebih tinggi dibandingkan pasien sehat. *Fluconazole* memicu reaksi radikal bebas (MDA) yang selanjutnya menginduksi kemotaksis *inflammatory cell* di sekitar *hair follicle epithelial cells* (HFEC). HFEC

meningkatkan ekspresi MHC dan ligan NKG2D kemudian NKG2D+ CD4+ T cell menjadi sel T efektor setelah berikatan pada kompleks antigen MHC I dan ligan NKG2D pada permukaannya. Sel T yang teraktivasi memproduksi IFN- γ melalui JAK1 dan JAK3 yang kemudian menstimulasi produksi IL-15 untuk menginduksi produksi IFN- γ yang berakibat pada kerusakan *hair follicle immune privilege* dan memicu serangan autoimun pada folikel rambut oleh sel radang seperti sel dendritic, sel T CD4+, sel T BK, dan sel mast⁴⁶.

Terdapat penurunan kadar MDA pada K2 yang diberi minoxidil topikal ($80,81 \pm 6,77$ pg/mL) dibandingkan dengan K1. Hal ini menunjukkan bahwa minoxidil memiliki efek protektif terhadap folikel melalui mekanisme antioksidatif secara tidak langsung yaitu peningkatan vaskularisasi folikel dan induksi growth factor yang memperkuat pertahanan seluler sehingga menurunkan reaksi peroksidatif, namun pemberian minoxidil topikal belum secara signifikan menekan kadar MDA pada kondisi *alopecia-like*.

Pemberian injeksi SH-MSCs pada K3 menunjukkan penurunan kadar MDA secara signifikan ($74,70 \pm 3,29$ pg/mL) dibandingkan dengan K1. Injeksi SH-MSCs secara tunggal menunjukkan penurunan MDA lebih baik dibandingkan kelompok kontrol positif yang diberi perlakuan minoxidil topikal. Hal ini membuktikan bahwa faktor-faktor bioaktif dalam SH-MSCs seperti IGF-1, VEGF, HGF, serta mediator anti-inflamasi yaitu IL-10 dapat mengurangi stres oksidatif secara langsung, memperbaiki regenerasi folikel,

dan mendorong lingkungan mikro yang kondusif untuk pertumbuhan rambut.

Pemberian treatment kombinasi SH-MSCs dan minoxidil topikal menunjukkan efek paling kuat dalam menurunkan kadar MDA dibandingkan kelompok lainnya. Hal tersebut menunjukkan sinergisme antara kemampuan SH-MSCs dalam menekan ROS dan menginduksi growth factor dengan kemampuan meningkatkan perfusi dan sensitization growth factor di dermal papilla. Kombinasi ini mengurangi kerusakan oksidatif secara lebih menyeluruh dan mendukung pemulihan folikel secara optimal.

Minoxidil merupakan salah satu terapi standar untuk pengobatan alopecia yang dapat menginduksi pertumbuhan rambut melalui aktivasi *ATP-sensitive potassium channel*, peningkatan VEGF dan *Fibroblast Growth Factor-7* (FGF-7), mengaktifasi jalur pensinyalan β -catenin pada *dermal papilla cell* (DPC), anti-inflamasi, dan anti-androgen^{47,48}.

Minoxidil menstimulasi *ATP-sensitive potassium channel*, terjadi vasodilatasi pembuluh darah sehingga menyuplai oksigen dan nutrient pada folikel rambut dan menstimulasi pertumbuhan rambut. Minoxidil menginduksi jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin dengan cara menstimulasi sekresi VEGF pada DPC sehingga memicu regenerasi folikel rambut. Stimulasi VEGF oleh Minoxidil berperan dalam vaskularisasi sehingga memperpanjang fase anagen folikel rambut. Pemberian Minoxidil meningkatkan sintesis DNA pada *anagen bulb*, sehingga onset fase anagen

akan terekspresi lebih awal. Selain itu, minoxidil berperan sebagai agen anti-inflamasi melalui penghambatan ekspresi gen *interleukin-1-alpha* (IL-1 α) dan prostasiklin serta berperan sebagai anti-androgen dengan menghambat ekspresi gen *5- α -reductase type II*⁴⁸⁻⁵⁰.

Efek farmakologi meliputi farmakokinetik dan farmakodinamik Minoxidil telah banyak diteliti. Berdasarkan penelitian sebelumnya, farmakokinetik Minoxidil meliputi absorpsi dan distribusi. Sekitar 1,4% Minoxidil yang diaplikasikan secara topikal diabsorpsi oleh kulit kepala. Hanya kurang dari 1% topikal Minoxidil yang diabsorpsi secara sistemik sehingga optimasi dosis, formula, dan *delivery system* dapat meningkatkan penetrasi pada kulit dan meningkatkan efikasi. Farmakodinamik meliputi efek biokimia dan fisiologis suatu obat. Metabolisme minoxidil topikal terjadi pada folikel rambut yaitu melalui *follicular sulfotransferase* yang kemudian dikonversi menjadi metabolit aktif yaitu minoxidil sulfat yang kemudian berperan dalam pertumbuhan rambut. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa terapi minoxidil 5% secara topikal pada pasien Alopecia Areata menunjukkan efikasi lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih rendah. Penggunaan konsentrasi Minoxidil yang lebih tinggi yaitu 15% memiliki kecenderungan pada peningkatan iritasi kulit kepala⁴⁹⁻⁵³.

SH-MSCs mengandung VEGF dan IL-10 yang berperan dalam menginduksi pertumbuhan rambut. VEGF memfasilitasi angiogenesis, menstimulasi vaskulasrisasi perifolikuler, laju pertumbuhan rambut, dan

meningkatkan ukuran folikel dan rambut ^{54,55}. Penggunaan SH-MSCs meningkatkan ekspresi VEGF pada DPC kemudian mengaktifasi jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin. Aktivasi pensinyalan Wnt/ β -catenin selanjutnya menginduksi transkripsi *growth factor* sehingga memicu fase anagen ⁵⁶.

IL-10 yang terkandung dalam SH-MSCs berperan sebagai sitokin anti-inflamasi. IL-10 menginduksi diferensiasi makrofag dari M1 proinflamasi menjadi M2 anti-inflamasi ^{57,58}. IL-10 dapat menekan kadar MDA yang tinggi pada kondisi alopecia yang mengakibatkan oksidasi lipid, protein, DNA, kerusakan membran sel dan organel, dan menginduksi kematian sel terprogram sehingga menghambat proliferasi dan migrasi sel folikel rambut. Penghambatan kadar MDA oleh IL-10 menekan CD8⁺NKG2D⁺ T cell dan menurunkan produksi autoantigen serta sitokin inflamasi yang disekresikan oleh *hair follicle epithelial cell* pada kondisi alopecia sehingga lingkungan immunosupresif pada *hair follicle immune privilege* dapat dipertahankan ⁵⁹⁻⁶¹.

Efek farmakologi meliputi farmakokinetik dan farmakodinamik. Injeksi SH-MSCs secara intradermal memungkinkan penghantaran sitokin dan *growth factor* secara langsung pada folikel rambut sehingga menghasilkan respon terapi yang lebih signifikan. Injeksi 100 μ L SH-MSCs memiliki efek farmakodinamik pada peningkatan IGF-1 dan penurunan MDA sehingga dapat memperbaiki kondisi alopecia. Selama penelitian dilaksanakan, semua tikus model menunjukkan pergerakan yang aktif dan kondisi kesehatan yang baik. Analisis histologi menunjukkan tidak ada kerusakan pada morfologi jaringan setelah pemberian SH-MSCs, sehingga

dapat disimpulkan bahwa SH-MSCs tidak bersifat toksik pada sel ^{40,62}.

Secara keseluruhan, peningkatan kadar IGF-1 dan penurunan kadar MDA pada K3 dan K4 menunjukkan bahwa modulasi inflamasi melalui jalur parakrin SH-MSCs dan optimasi perfusi oleh minoxidil merupakan pendekatan yang efektif untuk memulihkan homeostasis imun di sekitar folikel rambut. Peningkatan kadar IGF-1 mengurangi kerusakan langsung pada sel matriks folikel dan mempertahankan fase anagen, sedangkan penurunan kadar MDA melindungi *immune privilege* folikel dan mencegah destruksi autoimun. Kedua mekanisme ini saling melengkapi dalam mencegah progresi alopecia dan mendukung regenerasi rambut.

Penelitian ini hanya menganalisis dua parameter biokimia, yaitu kadar Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) dan malondialdehida (MDA) dengan metode ELISA, serta pengamatan histologi jaringan kulit. Meskipun pengamatan histologi dapat memberikan gambaran morfologi folikel rambut, penelitian ini belum melakukan analisis molekuler lebih lanjut, menggunakan quantitative PCR (qPCR) untuk mengevaluasi ekspresi gen yang berperan dalam pertumbuhan rambut (Wnt/ β -catenin, IGF, dan VEGF). Keterbatasan ini menyebabkan mekanisme kerja terapi SH-MSCs maupun kombinasinya dengan Minoxidil 5% topikal belum dapat dipahami secara komprehensif. Analisis qPCR pada penelitian mendatang dapat membantu menghubungkan perubahan kadar IGF-1 dan MDA dengan status histologi jaringan, sekaligus memperjelas jalur molekuler yang terlibat dalam regenerasi folikel rambut.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

6.1.1. Pemberian kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) 100µL dan minoxidil 5% topikal secara signifikan meningkatkan kadar IGF-1 pada tikus jantan galur wistar model *alopecia-like*.

6.1.2. Pemberian kombinasi injeksi intradermal *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) 100µL dan minoxidil 5% topikal secara signifikan menurunkan kadar MDA pada tikus jantan galur wistar model *alopecia-like*.

6.2. Saran

6.2.1. Analisis sitokin anti-inflamasi (IL-10) dan *growth factor* terkait lainnya (VEGF) untuk memberikan gambaran lebih menyeluruh mekanisme regenerasi folikel rambut.

6.2.2. Analisis molekuler menggunakan quantitative PCR (qPCR) untuk mengevaluasi ekspresi gen yang berperan dalam pertumbuhan rambut (Wnt/β-catenin, IGF, dan VEGF).

6.2.3. Untuk mengetahui pemberian dosis efektif SH-MSCs sebagai terapi *alopecia*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Peterle L, Sanfilippo S, Borgia F, Cicero N, Gangemi S. Alopecia Areata: A Review of the Role of Oxidative Stress, Possible Biomarkers, and Potential Novel Therapeutic Approaches. *Antioxidants*. 2023;12(1):135. doi:10.3390/antiox12010135
2. Pratt CH, King LE, Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. Alopecia areata. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3(1):17011. doi:10.1038/nrdp.2017.11
3. Żeberkiewicz M, Rudnicka L, Malejczyk J. Immunology of alopecia areata. *Central European Journal of Immunology*. 2020;45(3):325-333. doi:10.5114/ceji.2020.101264
4. Abdel Fattah N, Ebrahim A, El Okda E. Lipid peroxidation/antioxidant activity in patients with alopecia areata. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011;25(4):403-408. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03799.x
5. Strazzulla LC, Wang EHC, Avila L, et al. Alopecia areata. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(1):1-12. doi:10.1016/j.jaad.2017.04.1141
6. Suchonwanit P, Thammarucha S, Leerunyakul K. <p>Minoxidil and its use in hair disorders: a review</p>. *Drug Des Devel Ther*. 2019;Volume 13:2777-2786. doi:10.2147/DDDT.S214907
7. Fatani MIA, Alkhalifah A, Alruwaili AFS, et al. Diagnosis and Management of Alopecia Areata: A Saudi Expert Consensus Statement (2023). *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2023;13(10):2129-2151. doi:10.1007/s13555-023-00991-3
8. Harries MJ, Sun J, Paus R, King LE. Management of alopecia areata. *BMJ*. 2010;341(jul23 1):c3671-c3671. doi:10.1136/bmj.c3671
9. Dong L, Hao H, Liu J, et al. A Conditioned Medium of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Wnt7a Promotes Wound Repair and Regeneration of Hair Follicles in Mice. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1-13. doi:10.1155/2017/3738071
10. Miao H, Miao C, Li N, Han J. Human umbilical cord mesenchymal stem

- cell-derived extracellular vesicles harboring IGF-1 improve ovarian function of mice with premature ovarian insufficiency through the Nrf2/HO-1 pathway. *J Ovarian Res.* 2024;17(1):224. doi:10.1186/s13048-024-01536-8
11. Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, Salgado M, Badiavas E Van. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells Dev.* 2015;24(14):1635-1647. doi:10.1089/scd.2014.0316
 12. Sibbald C. Alopecia Areata: An Updated Review for 2023. *J Cutan Med Surg.* 2023;27(3):241-259. doi:10.1177/12034754231168839
 13. Thompson GR, Krois CR, Affolter VK, et al. Examination of Fluconazole-Induced Alopecia in an Animal Model and Human Cohort. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(2). doi:10.1128/AAC.01384-18
 14. Anindhita A, Ardhaninggar A, Setyaningrum T. Studi Retrospektif: Alopecia Areata A Retrospektif Study: Alopecia Areata. *Journal of Universitas Airlangga.* 2018;Vol. 30(3):255-263.
 15. Anindhita Ayu Ardhaninggar A. Penatalaksanaan Alopecia Areata (Treatment of Alopecia Areata). *Journal of Universitas Airlangga.* 2018;30(1):34-39.
 16. Li X, Zhang D, Yu Y, Wang L, Zhao M. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell secretome promotes skin regeneration and rejuvenation: From mechanism to therapeutics. *Cell Prolif.* 2024;57(4). doi:10.1111/cpr.13586
 17. Gupta PK, Bhat S, Kannan S, Seetharam RN, Kolkundkar U. Therapeutic Approach for Hair Growth and Regeneration Using Bioactive Formulation Containing Mesenchymal Stromal Cell-Derived Conditioned Medium. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.* 2023;13(03):182-208. doi:10.4236/jcdsa.2023.133017
 18. Deng W, Zhang Y, Wang W, et al. Hair follicle-derived mesenchymal stem cells decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce inflammation around the hair follicle. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):548.

doi:10.1186/s13287-021-02614-0

19. Tang L, Cao L, Sundberg JP, Lui H, Shapiro J. Restoration of hair growth in mice with an alopecia areata-like disease using topical anthralin. *Exp Dermatol*. 2004;13(1):5-10. doi:10.1111/j.0906-6705.2004.00098.x
20. Legiawati L, Suseno LS, Sitohang IBS, et al. Combination of adipose-derived stem cell conditioned media and minoxidil for hair regrowth in male androgenetic alopecia: a randomized, double-blind clinical trial. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):210. doi:10.1186/s13287-023-03440-2
21. Park BS, Kim WS, Choi JS, et al. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomedical Research*. 2010;31(1):27-34. doi:10.2220/biomedres.31.27
22. Upton JH, Hannen RF, Bahta AW, Farjo N, Farjo B, Philpott MP. Oxidative Stress–Associated Senescence in Dermal Papilla Cells of Men with Androgenetic Alopecia. *Journal of Investigative Dermatology*. 2015;135(5):1244-1252. doi:10.1038/jid.2015.28
23. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol*. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02837
24. Burja B, Barlič A, Erman A, et al. Human mesenchymal stromal cells from different tissues exhibit unique responses to different inflammatory stimuli. *Curr Res Transl Med*. 2020;68(4):217-224. doi:10.1016/j.retram.2020.05.006
25. Sari MI, Jusuf NK, Munir D, et al. The Role of Mesenchymal Stem Cell Secretome in the Inflammatory Mediators and the Survival Rate of Rat Model of Sepsis. *Biomedicines*. 2023;11(8):2325. doi:10.3390/biomedicines11082325
26. Ahangar P, Mills SJ, Cowin AJ. Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19):7038. doi:10.3390/ijms21197038

27. Horesh EJ, Chéret J, Paus R. Growth Hormone and the Human Hair Follicle. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13205. doi:10.3390/ijms222413205
28. Trüeb RM. Further Clinical Evidence for the Effect of IGF-1 on Hair Growth and Alopecia. *Skin Appendage Disord.* 2018;4(2):90-95. doi:10.1159/000479333
29. Li K, Sun Y, Liu S, et al. The AR/miR-221/IGF-1 pathway mediates the pathogenesis of androgenetic alopecia. *Int J Biol Sci.* 2023;19(11):3307-3323. doi:10.7150/ijbs.80481
30. Paus R. The Evolving Pathogenesis of Alopecia Areata: Major Open Questions. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* 2020;20(1):S6-S10. doi:10.1016/j.jisp.2020.04.002
31. Panchaprateep R, Asawanonda P. Insulin-like growth factor-1: roles in androgenetic alopecia. *Exp Dermatol.* 2014;23(3):216-218. doi:10.1111/exd.12339
32. Su HY, Hickford JGH, Palmer BR, Bickerstaffe R. Insulin-like growth factor 1 and hair growth. *Dermatol Online J.* 1999;5(2). doi:10.5070/D32V79R893
33. Smith TM, Gilliland K, Clawson GA, Thiboutot D. IGF-1 Induces SREBP-1 Expression and Lipogenesis in SEB-1 Sebocytes via Activation of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *Journal of Investigative Dermatology.* 2008;128(5):1286-1293. doi:10.1038/sj.jid.5701155
34. Cordiano R, Di Gioacchino M, Mangifesta R, Panzera C, Gangemi S, Minciullo PL. Malondialdehyde as a Potential Oxidative Stress Marker for Allergy-Oriented Diseases: An Update. *Molecules.* 2023;28(16):5979. doi:10.3390/molecules28165979
35. Ito T, Ito N, Bettermann A, Tokura Y, Takigawa M, Paus R. Collapse and Restoration of MHC Class-I-Dependent Immune Privilege. *Am J Pathol.* 2004;164(2):623-634. doi:10.1016/S0002-9440(10)63151-3
36. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology.* 2014;24(10):R453-R462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034

37. Cwynar A, Olszewska-Słonina D, Czajkowski R, et al. Investigation of oxidative stress in patients with alopecia areata by measuring the levels of malondialdehyde and ceruloplasmin in the blood. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2018;35(6):572-576. doi:10.5114/pdia.2017.68047
38. Ma Y qian, Sun Z, Li YM, Xu H. Oxidative stress and alopecia areata. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10. doi:10.3389/fmed.2023.1181572
39. Adams NR, Sanders MR, Briegel JR, Peter DW, Rigby RDG. Responses of sheep to annual cycles in nutrition. 2. Effects of diet and endogenous growth hormone during replenishment. *Animal Science*. 1996;62(2):287-292. doi:10.1017/S1357729800014594
40. Salhab O, Khayat L, Alaaeddine N. Stem cell secretome as a mechanism for restoring hair loss due to stress, particularly alopecia areata: narrative review. *J Biomed Sci*. 2022;29(1):77. doi:10.1186/s12929-022-00863-6
41. Suchonwanit P, Thammarucha S, Leerunyakul K. <p>Minoxidil and its use in hair disorders: a review</p>. *Drug Des Devel Ther*. 2019;Volume 13:2777-2786. doi:10.2147/DDDT.S214907
42. OTOMO S. Hair growth effect of minoxidil. *Folia Pharmacologica Japonica*. 2002;119(3):167-174. doi:10.1254/fpj.119.167
43. Choi N, Shin S, Song S, Sung JH. Minoxidil Promotes Hair Growth through Stimulation of Growth Factor Release from Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):691. doi:10.3390/ijms19030691
44. Abadi MKD, Yousefi G, Dehghani F, et al. The Effect of Mesenchymal Stem Cells Derived-Conditioned Media in Combination with Oral Anti-Androgenic Drugs on Male Pattern Baldness: An Animal Study. *Cell J*. 2023;25(11):790-800. doi:10.22074/CELLJ.2023.2008138.1377
45. Srivastava AS. *Issue 1 | Article 1041 Alopecia Areata: A Case Study*. Vol 5.; 2021.
46. Ma Y qian, Sun Z, Li YM, Xu H. Oxidative stress and alopecia areata. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10. doi:10.3389/fmed.2023.1181572
47. Premanand A, Ancy VB, Jeevanandam J, Rajkumari BR, Danquah MK.

- Phytochemicals as emerging therapeutic agents for alopecia treatment. In: *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. Elsevier; 2020:221-238. doi:10.1016/B978-0-12-817890-4.00014-7
48. Gupta AK, Talukder M, Shemar A, Piraccini BM, Tosti A. Low-Dose Oral Minoxidil for Alopecia: A Comprehensive Review. *Skin Appendage Disord*. 2023;9(6):423-437. doi:10.1159/000531890
 49. Hussein RS, Dayel S Bin, Abahussein O, El-Sherbiny AA. Applications and Efficacy of Minoxidil in Dermatology. *Skin Health and Disease*. 2024;4(6). doi:10.1002/ski2.472
 50. Gupta AK, Talukder M, Venkataraman M, Bamimore MA. Minoxidil: a comprehensive review. *Journal of Dermatological Treatment*. 2022;33(4):1896-1906. doi:10.1080/09546634.2021.1945527
 51. Ramos PM, Goren A, Sinclair R, Miot HA. Oral minoxidil bio-activation by hair follicle outer root sheath cell sulfotransferase enzymes predicts clinical efficacy in female pattern hair loss. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2020;34(1). doi:10.1111/jdv.15891
 52. Majewski M, Gardaś K, Waśkiel-Burnat A, Ordak M, Rudnicka L. The Role of Minoxidil in Treatment of Alopecia Areata: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med*. 2024;13(24):7712. doi:10.3390/jcm13247712
 53. Singh S, Patil A, Kianfar N, et al. Does topical minoxidil at concentrations higher than 5% provide additional clinical benefit? *Clin Exp Dermatol*. 2022;47(11):1951-1955. doi:10.1111/ced.15338
 54. Mathen C, Dsouza W. In vitro and clinical evaluation of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell-conditioned media for hair regeneration. *J Cosmet Dermatol*. 2022;21(2):740-749. doi:10.1111/jocd.14114
 55. Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(4):409-417. doi:10.1172/JCI11317
 56. Zhang B, Wu X, Zhang X, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal

- Stem Cell Exosomes Enhance Angiogenesis Through the Wnt4/ β -Catenin Pathway. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(5):513-522. doi:10.5966/sctm.2014-0267
57. Kim JE, Lee YJ, Lee KJ, Park SH, Kang H. Ex Vivo Treatment with Allogenic Mesenchymal Stem Cells of a Healthy Donor on Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Severe Alopecia Areata: Targeting Dysregulated T Cells and the Acquisition of Immunotolerance. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13228. doi:10.3390/ijms232113228
 58. Shimizu Y, Ntege EH, Sunami H, Inoue Y. Regenerative medicine strategies for hair growth and regeneration: A narrative review of literature. *Regen Ther.* 2022;21:527-539. doi:10.1016/j.reth.2022.10.005
 59. Ma T, Zhang T, Miao F, et al. Alopecia Areata: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapies. *MedComm (Beijing).* 2025;6(5). doi:10.1002/mco2.70182
 60. Sun X, Chen M. Oxidative stress activates the transplanted adipose-derived stem cells to exert antioxidant effects in alopecia treatment. *Redox Report.* 2025;30(1). doi:10.1080/13510002.2025.2503128
 61. Šutić Udović I, Hlača N, Massari LP, Brajac I, Kaštelan M, Vičić M. Deciphering the Complex Immunopathogenesis of Alopecia Areata. *Int J Mol Sci.* 2024;25(11):5652. doi:10.3390/ijms25115652
 62. Gunawardena TNA, Masoudian Z, Rahman MT, Ramasamy TS, Ramanathan A, Abu Kasim NH. Dental derived stem cell conditioned media for hair growth stimulation. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216003. doi:10.1371/journal.pone.0216003