

**PENGARUH *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS (EH-MSCs)* TERHADAP EKSPRESI
*GRANULOCYTE MACROPHAGE COLONY
STIMULATING FACTOR (GM-CSF)* DAN
*INTERLEUKIN - 1 ALPHA (IL-1 α)***

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL6 model Alopecia
Androgenik yang diinduksi Dihidrotestosteron)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Virgina Destiana Suhendar

MBK.24.23.010475

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

TESIS

**PENGARUH EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELL (EH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI
GRANULOCYTE MACROPHAGE COLONY
STIMULATING FACTOR (GM-CSF) DAN
INTERLEUKIN- 1 ALPHA (IL-1 α)**

(Studi eksperimental *In Vivo* Pada Mencit C57BL6 model Alopecia
Androgenik yang diinduksi Dihidrotestosteron)

Disusun oleh

Virgina Destiana Suhendar

MBK.24.23.010475

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

Pembimbing I



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

NIP. 210.113.160

Pembimbing II



Dr. dr. Sri Priyanti Mulyani, Sp.A

NIP. 210.105.097

Mengetahui,

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



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

NIP. 210.113.160

PERNYATAAN

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

Semarang, 29 Agustus 2025



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Virgina Destiana Suhendar
Tempat / tanggal lahir : Bandung, 05 Desember 1991
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK YWKA Bandung : Lulus tahun 1997
2. SD YWKA Bandung : Lulus tahun 2004
3. SMP Taruna Bakti Bandung : Lulus tahun 2007
4. SMA Taruna Bakti Bandung : Lulus tahun 2010
5. S1 FK Universitas Kristen Maranatha : Lulus tahun 2014
6. Profesi Dokter Universitas Kristen Maranatha : Lulus tahun 2016
7. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : 2023 - Sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Suami : Alief Leisyah
2. Nama Anak : Galena Sabiya Leisyah
Geradhya Tanveer Leisyah

KATA PENGANTAR

Puji syukur terpanjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga proposal tesis dengan judul “**Pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* terhadap Ekspresi *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)* dan *Interleukin- 1 Alpha (IL-1α)* (Studi eksperimental In Vivo Pada Mencit C57BL6 model Alopecia Androgenik yang diinduksi Dihidrotestosteron)**” ini dapat penulis selesaikan.

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

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

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

7. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan , Sp. KK, Subsp. DKE, FINS DV selaku penguji II yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
8. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes. selaku penguji III yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
10. Segenap staf administrasi program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
11. Kedua orang tua dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doanya.
12. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

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

Semarang, 29 Agustus 2025

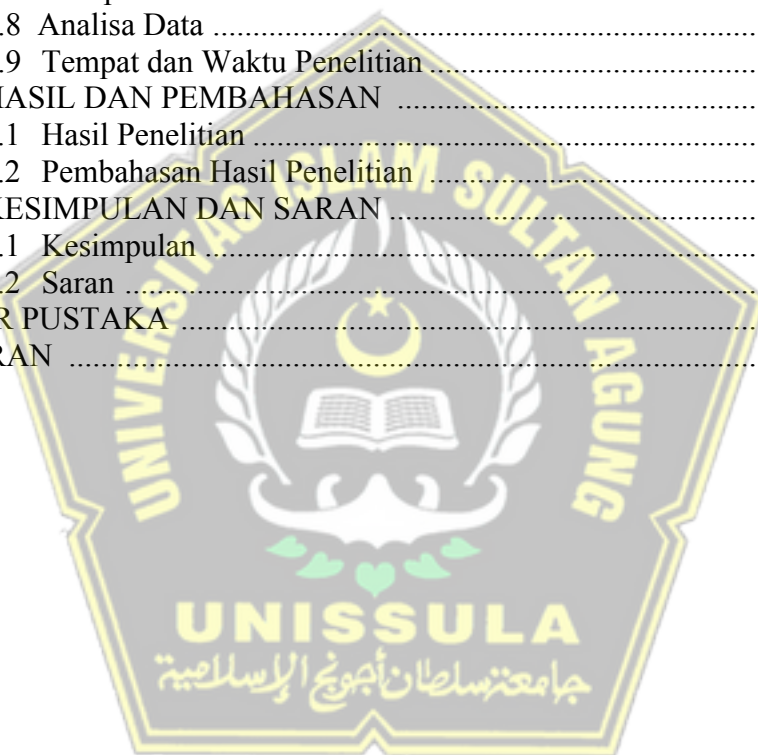
Penulis

(Virgina Destiana Suhendar)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR SINGKATAN	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
ABSTRAK	xiii
<i>ABSTRACT</i>	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Umum	5
1.3.2 Khusus	5
1.4 Originalitas Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	8
1.5.1 Teoritis	8
1.5.2 Praktis	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Alopecia	9
2.1.1 Definisi	9
2.1.2 Alopecia Androgenik (AGA)	10
2.2 <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (GM-CSF) ...	17
2.2.1 Definisi	17
2.2.2 Peran GM-CSF pada Alopecia Androgenik	18
2.3 <i>Interleukin -1 alfa</i> (IL-1 α)	20
2.3.1 Definisi	20
2.3.2 Faktor yang mempengaruhi produksi IL-1 α	21
2.4 <i>Exosome hypoxia</i> MSC (EH-MSC)	22
2.4.1 Definisi	22
2.4.2 Kandungan <i>Exosome</i> MSC	23
2.4.3 Metode Isolasi <i>Exosome</i> MSC	24
2.4.4 Hipoksia	27
2.5 Efek <i>Exosome hypoxia mesenchymal stem cell</i> terhadap ekspresi GM-CSF dan IL-1 α pada Alopecia	27

III.	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....	29
	3.1 Kerangka Teori	29
	3.2 Kerangka Konsep	36
	3.3 Hipotesis	36
IV.	METODE PENELITIAN	36
	4.1 Jenis penelitian dan rancangan penelitian	37
	4.2 Variabel penelitian dan Definisi Operasional	38
	4.3 Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	40
	4.4 Besar sampel	41
	4.5 Alat dan Bahan	42
	4.6 Cara Penelitian	42
	4.7 Alur penelitian	52
	4.8 Analisa Data	53
	4.9 Tempat dan Waktu Penelitian	54
V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	55
	5.1 Hasil Penelitian	55
	5.2 Pembahasan Hasil Penelitian	65
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	69
	6.1 Kesimpulan	69
	6.2 Saran	69
	DAFTAR PUSTAKA	70
	LAMPIRAN	80



DAFTAR SINGKATAN

AA	: <i>Alopecia Areata</i>
ADSC-Exos	: <i>Adipose-Derived Stem Cell Exosomes</i>
AGA	: <i>Alopecia Androgenic</i>
A-PRP	: <i>Non Activated Platelet-Rich Plasma</i>
bFGF	: <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMPs	: <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
DHT	: <i>Dihydrotestosterone</i>
EH-MSC	: <i>Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
GA	: <i>Galea Aponeurotica</i>
GDFs	: <i>Growth Differentiation Factors</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HaCaT	: <i>Spontaneously Transformed Human Keratinocyte Cell Culture</i>
HFM	: <i>Hair Follicle Miniaturisation</i>
hUCB-MSC	: <i>Human Umbilical Cord Blood-Mesenchymal Stem Cell</i>
IGF-1	: <i>Insulin Growth Factor - 1</i>
IL-1 α	: <i>Interluekin-1 alpha</i>
IL-10	: <i>Interluekin-10</i>
LLLT	: <i>Low Level Laser Therapy</i>
MAPK/ERK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase / Extracellular-Signal-Regulated Kinase</i>
miRNA	: <i>Micro Ribonucleic Acid</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
PEG	: <i>Polyethylene Glycol</i>
PMN	: <i>Polymononuclear</i>
PRP	: <i>Platelet Rich Plasma</i>

ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TE	: <i>Telogen Effluvium</i>
TGF- β	: <i>Tumor Growth Factor - Beta</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor - alpha</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.4	Originalitas Penelitian	6
Tabel 5.1	Data Hasil Analisis ekspresi GM-CSF	60
Tabel 5.2	Perbedaan rerata ekspresi GM-CSF antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane	61
Tabel 5.3	Data Hasil Analisis Ekspresi IL-1 α	62
Tabel 5.4	Perbedaan rerata ekspresi IL-1 α antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc LSD	63



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Dermoskopik kulit kepala pada berbagai tahap alopecia	10
Gambar 2.2	<i>Androgen – dependent signaling pathway</i> pada <i>dermal papilla cells</i>	12
Gambar 2.3	Representasi skema anatomi folikel rambut	13
Gambar 2.4	<i>Scalp follicular cycle</i> : Fase anagen (<i>cell proliferation</i>), fase katagen (<i>involution</i>), dan fase telogen (<i>resting</i>). Fase kenogen (fase tanpa adanya produksi rambut)	14
Gambar 2.5	Sejumlah faktor yang berkontribusi terhadap patogenesis alopecia androgenetik	15
Gambar 2.6	Gambar skematik AR/miR-221/IGF1 axis dalam meregulasi <i>MAPK pathway</i> dan <i>PI3K/AKT pathway</i>	17
Gambar 2.7	Gambar Skema yang mengilustrasikan bagaimana dosis GM-CSF memilih modul sinyal yang akan diaktifkan	19
Gambar 3.1	Kerangka Teori	35
Gambar 3.2	Kerangka Konsep	36
Gambar 4.1	Skema Rancangan Penelitian	37
Gambar 4.2	Isolasi MSC dan Pembuatan Exosome	45
Gambar 4.3	Alur Penelitian	52
Gambar 5.1	Morfologi MSC	55
Gambar 5.2	Kemampuan MSC berdiferensiasi	56
Gambar 5.3	Hasil Analisis Kadar <i>Exosome</i> menggunakan marker CD63 dan CD9	57
Gambar 5.4	Validasi makroskopis mencit sebelum dan setelah perlakuan	58
Gambar 5.5	Hasil mikroskopis pasca pemberian EH-MSCs	59
Gambar 5.6	Grafik ekspresi GM-CSF	62
Gambar 5.7	Grafik ekspresi IL-1 α	64

ABSTRAK

Latar Belakang: *Alopecia androgenetik* (AGA) merupakan gangguan kerontokan rambut kronis dan progresif yang ditandai dengan miniaturisasi folikel dan pemendekan fase anagen. AGA berdampak pada kualitas hidup penderitanya. Penelitian menunjukkan bahwa *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) dan *Interleukin-1 alpha* (IL-1 α) memiliki peran penting dalam gen regeneratif dan anti-inflamasi. Eksosom dari sel punca mesenkim (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*, EH-MSCs) diketahui mengandung molekul bioaktif yang dapat mendukung regenerasi jaringan dan mengatur siklus rambut. Namun, studi mengenai pengaruh EH-MSCs terhadap ekspresi GM-CSF dan IL-1 α pada model alopecia masih terbatas.

Metode: Studi eksperimental *in vivo* secara *Randomized Post Test only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan model mencit C57BL6 jantan yang diinduksi alopecia oleh DHT. Mencit dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, termasuk kelompok kontrol sehat, kontrol DHT, terapi minoxidil, serta dua dosis injeksi EH-MSCs (100 μ g/kgBB dan 200 μ g/kgBB). Analisis ekspresi GM-CSF dan IL-1 α dilakukan menggunakan metode PCR pada sampel kulit mencit. ANOVA satu arah dengan pengujian hubungan antar kelompok, dilakukan uji Post Hoc Tamhane dan Post Hoc LSD diterapkan dalam pemeriksaan statistik perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil: Dibandingkan dengan kelompok kontrol, analisis ekspresi GM-CSF pada K5 ($3,42 \pm 0,31$) dan K4 ($2,91 \pm 1,01$) tertinggi. Di sisi lain, ekspresi IL-1 α pada K4 ($1,28 \pm 0,48$) dan K5 ($0,95 \pm 0,33$) terendah. Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis 100 μ g/kgBB dan 200 μ g/kgBB EH-MSC dapat meningkatkan ekspresi GM-CSF dan menurunkan IL-1 α secara signifikan.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) EH-MSC dosis 100 μ g/kgBB dan 200 μ g/kgBB terhadap peningkatan ekspresi GM-CSF dan penurunan ekspresi IL-1 α pada mencit model alopecia androgenik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata Kunci: *alopecia androgenik, GM-CSF, IL-1 α dan EH-MSCs*

ABSTRACT

Background: Androgenetic alopecia (AGA) is a chronic and progressive hair loss disorder marked by follicular miniaturization and a shortened anagen phase. AGA can impact their quality of life. Research shows that Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and Interleukin-1 alpha (IL-1 α) play a crucial role in regenerative and anti-inflammatory gene expression. Exosomes from mesenchymal stem cells (EH-MSCs) are known to contain bioactive molecules that can support tissue regeneration and regulate the hair cycle. However, studies on the effect of EH-MSCs on GM-CSF and IL-1 α expression in alopecia models are still limited.

Methods: This was an in vivo experimental study using a randomized post-test only control group design. This study used a male mice C57BL6 model induced by DHT. Mice were divided into five treatment groups: healthy controls, DHT control, minoxidil therapy, and two doses of EH-MSCs (100 μ g/kgBB and 200 μ g/kgBB). GM-CSF and IL-1 α expression were analyzed using PCR on mice skin samples. One-way ANOVA with intergroup correlation testing, post hoc Tamhane and post hoc LSD tests were applied to statistically examine differences between treatment groups.

Results: Compared with the control group, GM-CSF expression was highest in K5 (3.42 ± 0.31) and K4 (2.91 ± 1.01). Conversely, IL-1 α expression was lower in K4 (1.28 ± 0.48) and K5 (0.95 ± 0.33). Overall, the results of this study indicate that doses of 100 μ g/kgBB and 200 μ g/kgBB EH-MSCs can significantly increase GM-CSF expression and decrease IL-1 α .

Conclusion: Administration of EH-MSCs (Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells) at doses of 100 μ g/kgBB and 200 μ g/kgBB increased GM-CSF expression and decreased IL-1 α expression in androgenic alopecia model mice compared to the control group.

Key Words: alopecia androgenic, GM-CSF, IL-1 α , and EH-MSCs

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alopecia adalah tidak adanya atau hilangnya rambut di area yang seharusnya ditumbuhi rambut. Kondisi ini dapat bersifat lokal atau difus, sementara atau permanen, dan memengaruhi kedua jenis kelamin dan semua kelompok usia. Dikenal sebagai tanda atau gejala yang timbul dari etiologi heterogen, alopecia secara umum diklasifikasikan sebagai *nonscarring* (paling umum) dan *scarring* (scatricial).¹

Alopecia androgenik (AGA) merupakan alopecia non-sikatrik yang umum, AGA sering terjadi selama dan setelah pubertas dan ditandai dengan miniaturisasi folikel rambut progresif dan kerontokan rambut. Insiden penyakit ini meningkat seiring bertambahnya usia.² Ras Kaukasia tercatat lebih banyak menderita AGA, lalu diikuti oleh ras Asia, dan Afrika Amerika, selanjutnya *Native American* dan populasi *Inuit*.³ Studi di Indonesia sebelumnya pada periode 2009-2011 tercatat 39,7% penderita AGA lalu diikuti kelainan rambut TE sebanyak 34,5%, dan AA 11,2%.⁴ AGA merupakan kelainan yang ditentukan secara genetik yang menimbulkan respon berlebihan hormon androgen, hal ini memengaruhi terjadinya AGA sebanyak 50% pada pria dan wanita.⁵ Frekuensi AGA meningkat seiring bertambahnya usia pada pasien, 30% pasien berusia 30 tahun dan 50% pasien berusia 50 tahun terkena kondisi ini. Angka ini meningkat hingga 70% pada usia yang

lebih tua.²

Kondisi AGA ditandai dengan hilangnya rambut terminal pada kulit kepala secara progresif, biasanya terjadi setelah pubertas dengan pola yang khas pada pria dan wanita. AGA pada pria ditandai dengan kerontokan rambut yang paling menonjol di daerah vertex dan fronto temporal, sedangkan pada wanita, muncul dengan penipisan rambut di atas kulit kepala bagian atas yang menyebar. Gangguan ini cukup umum terjadi pada wanita, dengan insidennya menunjukkan peningkatan yang signifikan setelah menopause.⁵ Meskipun sering diyakini sebagai kondisi medis yang jinak, alopecia androgenik dapat memiliki efek dramatis pada penampilan dan harga diri seseorang. Ketika orang memahami bahwa kerontokan rambut merugikan mereka dari sudut pandang sosial, hal itu dapat berdampak signifikan pada kesejahteraan psikologis mereka yang berdampak pada *quality of life (QOL)* setiap individu.⁴

Beragamnya pilihan pengobatan yang tersedia dan kurangnya standarisasi di antara studi yang ada semakin mempersulit pemilihan pengobatan.⁸ Ada berbagai metode untuk menghambat perkembangan kerontokan rambut, seperti minoksidil topikal, inhibitor 5 α reduktase oral (seperti finasterida, yang umum digunakan pada pasien pria), spironolakton (sering digunakan pada pasien wanita), transplantasi rambut, terapi laser energi rendah (LLLT), plasma kaya trombosit (PRP), transplantasi rambut, dan terapi kombinasi. Namun, metode perawatan non-bedah yang ada tidak hanya memiliki masa perawatan yang panjang, tetapi juga tidak memiliki

efek yang jelas dalam memperbaiki kerontokan rambut sedang dan parah, sementara transplantasi rambut mahal, invasif, dan tidak dapat menghambat perkembangan penyakit.⁷ Minoksidil topikal merupakan pengobatan untuk alopecia dan juga digunakan di luar label untuk jenis kerontokan rambut lainnya. Minoksidil topikal dianggap dapat melebarkan pembuluh darah kulit kepala, sehingga mendorong pertumbuhan rambut dengan meningkatkan pengiriman nutrisi ke folikel rambut. Penelitian terkini menunjukkan bahwa minoksidil oral dosis rendah (2,5-5 mg/hari untuk pria dan 0,25-1,25 mg setiap hari untuk wanita) dapat aman dan efektif tetapi harus digunakan dengan hati-hati.⁹ Hasil penggunaan minoksidil belum memuaskan dan mungkin memiliki efek samping yang disebutkan di atas. Oleh karena itu, saya memutuskan untuk menggunakan *exosome* sebagai solusi untuk masalahnya.

Exosome hypoxia MSC merupakan microvesicle diproduksi oleh MSC pada medium kultur dalam kondisi hipoksia. Studi terbaru menunjukkan bahwa EH-MSC memiliki potensi untuk mengurangi alopecia melalui berbagai mekanisme, termasuk melalui jalur protein dan microRNA (miRNA) tertentu.^{3,6,10} Eksosom MSC mengandung berbagai macam protein, seperti faktor pertumbuhan dan sitokin, yang dapat merangsang pertumbuhan rambut dan memodulasi siklus pertumbuhan rambut.^{11,12} Selain itu, eksosom MSC juga mengandung miRNA yang dapat mempengaruhi ekspresi gen yang terlibat dalam regulasi siklus rambut.

Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) adalah glikoprotein kecil yang mampu merangsang pembentukan neutrofil polimorfonuklear (PMN) serta monosit mononuklear, makrofag (MØs) dan sel dendritik (DC).⁶ Ekspresi gen pada faktor perangsang koloni granulosit (G-CSF), Faktor Stimulasi Koloni Makrofag (M-CSF), dan Stimulasi Koloni Makrofag Granulosit Faktor (GM-CSF), glikoprotein yang disekresikan, mengatur proliferasi granulosit dan makrofag. Studi terbaru mengungkapkan bahwa GM-CSF dapat berkembang penyakit autoimun dan penyakit inflamasi selain itu fungsi pro-inflamasi.¹³ GM-CSF tidak selalu merugikan dalam pengaturan autoimun dan juga telah terbukti bermanfaat melalui penekanan respon imun yang tidak diinginkan.⁶ Selanjutnya, IL-1 α merupakan agen penghambat pertumbuhan langsung pada folikel rambut dan merupakan aktor penting dalam patogenesis AGA, TE, dan AA. Dengan mempertimbangkan vitamin, flavonoid, dan elemen jejak yang diidentifikasi dalam analisis fitokimia.¹⁴ IL-1 α menghambat pertumbuhan rambut yang kuat, pada sel keratinosit manusia (HaCaT) yang diobati dengan minoksidil untuk menentukan apakah molekul ini memberikan efek antiinflamasi.¹⁵ Efek antiperadangan minoksidil ini, sebagaimana dibuktikan oleh penurunan ekspresi gen IL-1 α yang signifikan dalam sel HaCaT, dapat menjadi salah satu mekanisme kerjanya pada alopecia.¹⁶

Penelitian lain melaporkan bahwa EH-MSC mampu meregulasi baik in vitro maupun in vivo.^{17,18} Namun demikian, penelitian mengenai pengaruh EH-MSC terhadap Ekspresi GM-CSF dan IL-1 α masih sangat terbatas

sehingga masih perlu untuk dilakukan kajian.

1.2.Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap Ekspresi GM-CSF dan IL-1 α pada Mencit model Alopecia Androgenik C57BL6 yang diinduksi Dihidrotestosteron?

1.3.Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Tujuan umum yang ingin dicapai penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap Ekspresi GM-CSF dan IL-1 α yang diinduksi Dihidrotestosteron pada Mencit C57BL6.

1.3.2. Tujuan khusus

1.3.2.1. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan Ekspresi GM-CSF pada Mencit C57BL6 yang diinduksi DHT yang diberikan *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$ dengan dibandingkan kelompok kontrol.

1.3.2.2. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan Ekspresi IL-1 α pada Mencit C57BL6 yang diinduksi Dihidrotestosteron yang diberikan *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dosis 100 $\mu\text{g/kgBB}$ dan dosis 200 $\mu\text{g/kgBB}$ dengan dibandingkan kelompok kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Variabel Bebas	Hasil
1.	Pietro Gentile, Simon e Garcovich, 2020 ⁷³	<i>Autologous Activated Platelet-Rich Plasma (AA-PRP) and Non activated (A-PRP) in hair growth : a retrospective, blinded, randomized evaluation in androgenetic alopecia</i>	Pemberian AA-PRP dan A-PRP	Pemberian AA-PRP menyebabkan peningkatan <i>hair density</i> sebesar $31 \pm 2\%$
2.	Dong Ho Bak <i>et al</i> ¹⁷ 2020	<i>Protective effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against dexamethasone-induced apoptotic cell death in hair follicles</i>	Pemberian sel punca mesenkimal darah tali pusat manusia yang direkayasa	hUCB-MSCs meningkatkan protein untuk induksi rambut secara in vitro seperti IGFBP-1 dan VEGF
3.	JMD Legrand <i>et al.</i> , 2016. ¹⁶	<i>STAT5 Activation in the Dermal Papilla Is Important for Hair Follicle Growth Phase Induction</i>	Aktivasi STAT5 di papila dermal (DP); Penghapusan gen STAT5A/B secara kondisional	Aktivasi STAT5 di DP terbukti penting untuk memicu masuknya fase anagen pada siklus rambut. Penghapusan STAT5 menunda masuknya anagen, menurunkan ekspresi gen seperti Wnt6, FGF7, FGF10, follistatin, dan TNF- α , serta meningkatkan

				ekspresi inhibitor seperti Dkk3 dan Dlk1.
4	Mert Ersan et al ⁷⁴ 2024	<i>Effectiveness of Exosome Treatment in Androgenetic Alopecia outcomes of a Prospective Study</i>	Pemberian Mesenchymal stromal cells derived exosome injection	Pemberian injeksi mesenchymal stromal cells derived exosome meningkatkan densitas rambut.
5	Yongcui Mao, Pinyan Liu, Jiayun Wei, Ye Xie, Qiuxia Zheng, Xuekai Hu, Jia Yao, Wenbo Meng ⁶⁶ 2024	<i>Exosomes derived from Umbilical cord mesenchymal stem cell promote hair regrowth in C57BL6 mice through upregulation of the RAS/ERK signaling pathway</i>	Pemberian Eksosom yang berasal dari sel induk mesenkimal tali pusat	Efek terapeutik eksosom yang berasal dari MSC tali pusat pada alopecia androgenetik dan memverifikasi bahwa eksosom mengatur stemness sel induk folikel rambut melalui jalur RAS/ERK untuk meningkatkan proliferasi rambut

Berdasarkan kajian beberapa penelitian terdahulu, ditemukan bahwa telah dilakukan penelitian mengenai terapi alopecia, namun demikian belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap Ekspresi GM-CSF dan IL-1 α pada mencit C57BL6 sehingga penelitian ini layak untuk dilakukan.

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Manfaat yang ingin didapat dari penelitian ini adalah memberikan bukti ilmiah peran *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap Ekspresi GM-CSF dan IL-1 α pada Mencit C57BL6 model Alopecia Androgenik yang diinduksi Dihidrotestosteron.

1.5.2. Manfaat Praktis

1.5.2.1. Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan yang berguna bagi masyarakat mengenai kegunaan *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* untuk perlindungan kerontokan rambut.

1.5.2.2. Bagi praktisi kesehatan, temuan ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi dengan *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* sebagai agen antiinflamasi bagi individu yang terpapar Dihidrotestosteron dengan intensitas tinggi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alopecia

2.1.1 Definisi

Alopecia adalah tidak adanya atau hilangnya rambut di area yang seharusnya ada. Alopecia dapat bersifat lokal atau difus, sementara atau permanen. Kondisi ini dapat memengaruhi kedua jenis kelamin dan semua kelompok usia. Dikenal sebagai tanda atau gejala yang timbul dari etiologi heterogen, alopecia secara umum diklasifikasikan sebagai *nonscarring* (paling umum), dan *scarring (scatricial)*.¹⁹ Homeostasis folikel rambut (HF) diatur oleh berbagai jalur pensinyalan. Gangguan homeostasis tersebut menyebabkan gangguan HF, seperti alopecia, kehilangan pigmen, dan penuaan rambut, yang menyebabkan masalah kesehatan yang parah dan masalah estetika. Di antara gangguan ini, penuaan rambut ditandai dengan rambut beruban, rambut rontok, miniaturisasi folikel rambut (HFM), dan perubahan struktural pada batang rambut. Penuaan rambut terjadi dalam kondisi fisiologis, sedangkan penuaan rambut dini sering dikaitkan dengan kondisi patologis tertentu. Banyak penelitian telah dilakukan untuk menentukan mekanisme dan mengeksplorasi perawatan untuk mencegah penuaan rambut. Hipotesis paling terkenal tentang penuaan rambut meliputi stres oksidatif, gangguan hormonal, peradangan, serta kerusakan DNA dan cacat perbaikan. Pada akhirnya, faktor-faktor ini menimbulkan ancaman bagi sel-sel HF, terutama sel punca seperti sel punca folikel rambut, sel

punca melanosit, dan sel punca mesenkimal, yang menghambat regenerasi dan pigmentasi rambut.⁷⁸

2.1.2 Alopecia Androgenetik (AGA)

Alopecia androgenetik disebut sebagai alopecia androgenik, alopecia hereditas, kebotakan pria, alopecia pola wanita, dan kerontokan rambut pola wanita, untuk menyebutkan beberapa di antaranya. Pria cenderung kehilangan rambut di kulit kepala bagian atas, bitemporal, dan bagian tengah frontal, sedangkan wanita cenderung kehilangan rambut di seluruh kulit kepala bagian tengah, dengan keterlibatan minimal pada garis rambut bagian depan.¹⁹

Alopecia androgenetik (AGA) adalah alopecia non-jaringan parut yang paling umum dan ditandai dengan kerontokan rambut berpola yang jelas dan bertahap. Alopecia androgenetik dimediasi oleh predisposisi genetik dan sensitivitas folikel yang berlebihan terhadap androgen, terutama pada pria, yang menyebabkan konversi progresif rambut terminal kulit kepala menjadi rambut vellus.²⁰

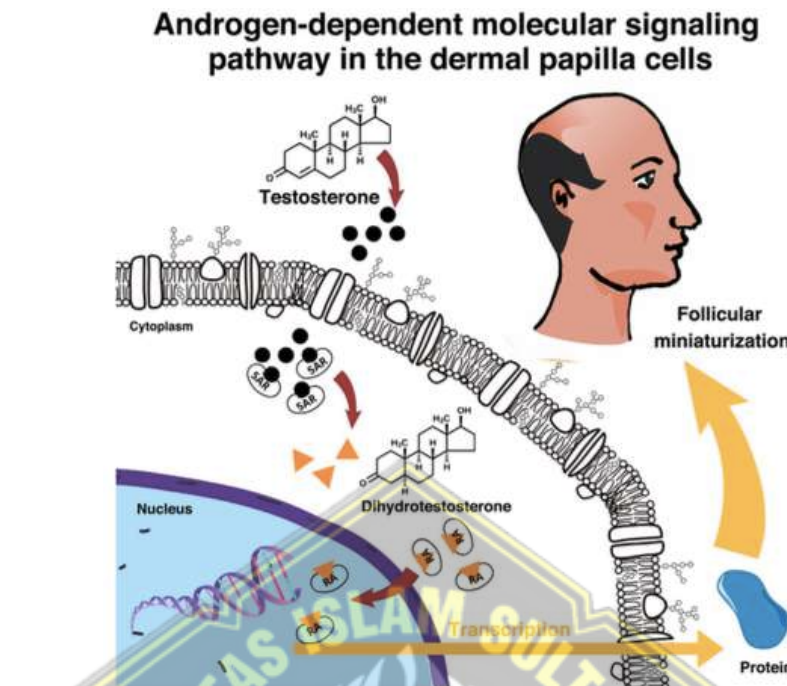


Gambar 2.1. dermoskopik kulit kepala pada berbagai tahap alopecia.²¹

Penjelasan gambaran diatas a.) Kulit kepala normal dengan 2-4 helai rambut di sebagian besar unit folikel. b.) Alopecia androgenik dini dengan campuran beberapa helai rambut dan satu helai rambut di unit folikel. c.) Alopecia androgenik lanjut dengan helai rambut tipis dan satu helai rambut di sebagian besar unit folikel²¹

2.1.2.1 Patogenesis AGA (Alopecia Androgenetik)

Alopecia Androgenetik dimediasi oleh androgen dan genetik, dan bahwa dihidrotestosteron (DHT) suatu metabolit testosteron memainkan peran kausal dalam perkembangannya. Pada sel-sel papila dermal (DP) dan jaringan di sekitar folikel rambut yang rentan terhadap AGA, DHT menempel pada reseptor androgen (AR) setelah diubah dari testosteron bebas melalui enzim 5-alfa reduktase tipe II (5- α R2). DHT mempunyai afinitas 5 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan testosteron terhadap AR. DHT yang terakumulasi dalam jaringan yang sensitif terhadap androgen menjadikan folikel rambut mengecil, mengakibatkan rambut menipis dan akhirnya menjadi AGA.^{7,23}

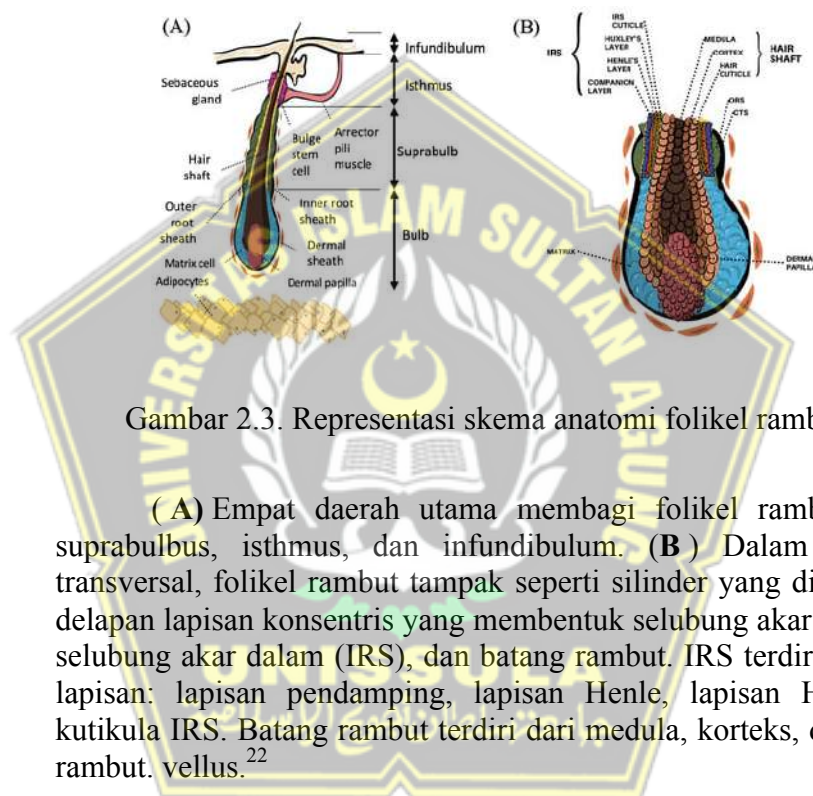


Gambar 2.2. *Androgen – dependent signaling pathway* pada *dermal papilla cells*.²³

Ketegangan kulit kepala kronis pada bagian GA (*Galea Aponeurotica*) yang dimediasi oleh pertumbuhan tulang tengkorak saat pubertas dan pasca pubertas dan/atau perkembangan berlebihan serta kontraksi kronis otot-otot yang terhubung ke GA memicu perjalanan dari AGA. Ketegangan ini memicu kaskade pro-inflamasi (peningkatan ROS, sinyal COX-2, IL-1, TNF β , dll.) yang memicu TGF- β bersamaan dengan peningkatan aktivitas androgen (5- α R2, DHT, dan AR), yang selanjutnya meningkatkan ekspresi TGF- β 1 pada jaringan yang rentan terhadap AGA yang sudah mengalami peradangan. Kehadiran DHT dan TGF- β 1 secara bersamaan memediasi fibrosis perifolikular, penebalan selubung dermal, dan kalsifikasi jaringan kapiler yang mendukung folikel rambut yang rentan terhadap AGA. Kondisi kronis dan progresif ini merupakan faktor

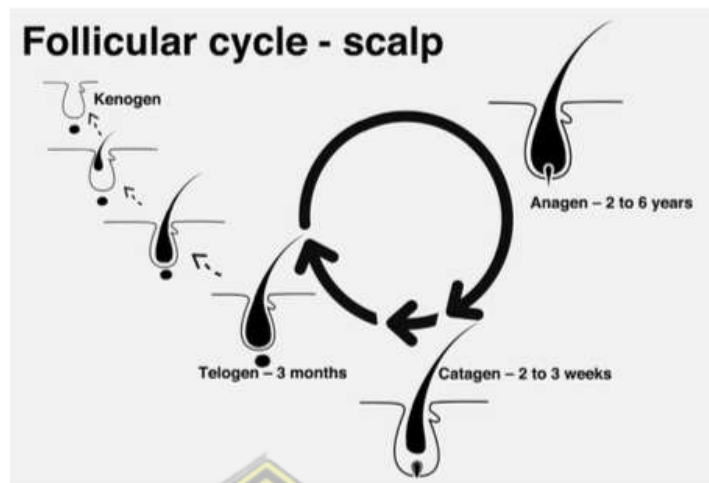
pembatas laju pemulihan AGA. Kondisi ini membatasi ruang pertumbuhan folikel dan mengurangi pasokan oksigen dan nutrisi ke jaringan yang rentan terhadap AGA-yang menyebabkan degradasi jaringan, miniaturisasi folikel rambut, dan akhirnya kebotakan pola.⁷

2.1.2.2 Biologi dan Genomik Folikel Rambut pada Alopecia Androgenetik



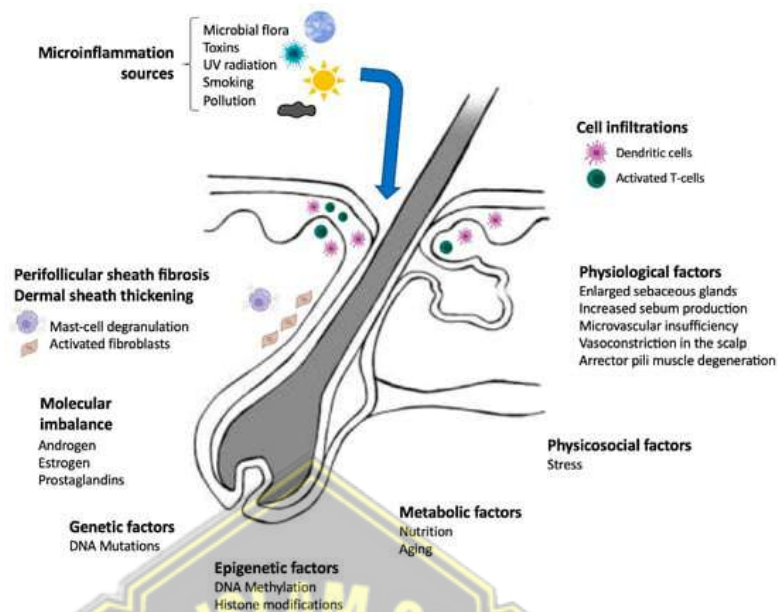
Gambar 2.3. Representasi skema anatomi folikel rambut²²

(A) Empat daerah utama membagi folikel rambut: bulbus, suprabulbus, isthmus, dan infundibulum. (B) Dalam pandangan transversal, folikel rambut tampak seperti silinder yang dibentuk oleh delapan lapisan konsentris yang membentuk selubung akar luar (ORS), selubung akar dalam (IRS), dan batang rambut. IRS terdiri dari empat lapisan: lapisan pendamping, lapisan Henle, lapisan Huxley, dan kutikula IRS. Batang rambut terdiri dari medula, korteks, dan kutikula rambut vellus.²²



Gambar 2.4. *Scalp follicular cycle* : Fase anagen (*cell proliferation*), fase katagen (*involution*), dan fase telogen (*resting*). Fase kenogen (fase tanpa adanya produksi rambut)²³

Reduksi fase anagen prematur yang memasuki fase katagen sehingga mengakibatkan pergeseran rasio anagen-telogen. Predominansi rasio fase telogen rambut mengakibatkan pasien merasakan adanya penipisan rambut. Pada beberapa studi tahapan rambut yang masuk kedalam tahapan fase katagen merupakan suatu konsekuensi dari penurunannya ekspresi dari beberapa faktor yang menunjang fase anagen seperti *Insulin growth factor* IGF-1, *basic fibroblast growth factor* bFGF, dan *vascular endothelial growth factor* VEGF serta adanya peningkatan ekspresi beberapa sitokin yang memicu apoptosis sel yaitu TGF- β 1, IL-1 α , dan TNF- α .²³



Gambar 2.5. Sejumlah faktor yang berkontribusi terhadap patogenesis alopecia androgenetik.²²

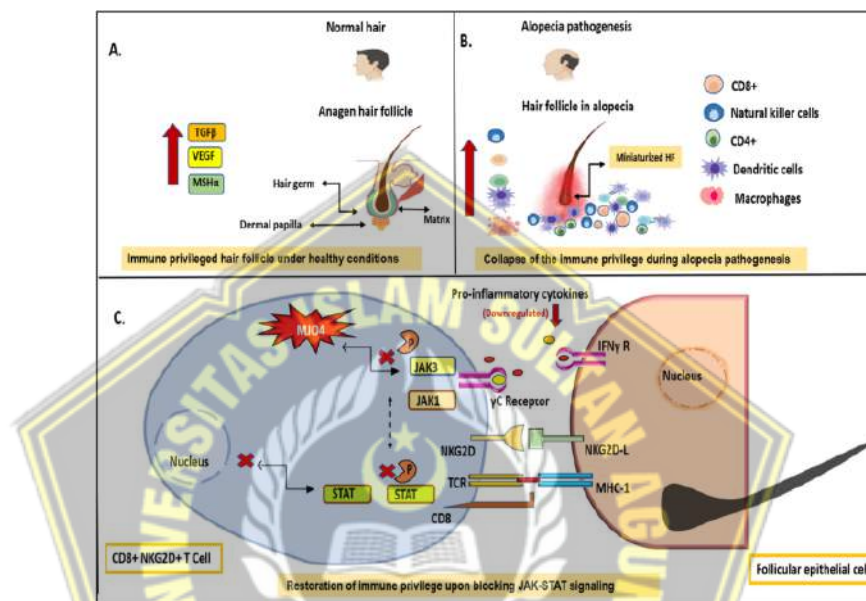
Mikroinflamasi merupakan suatu isu yang penting dalam perkembangan penyakit pada AGA. Faktanya semakin superfisial inflamasi yaitu pada bagian infundibulum mengindikasikan adanya kolonisasi *Propionibacterium sp*, *Staphylococcus sp*, dan *Malassezia* beberapa mikroorganisme tersebut dapat berkontribusi mengeluarkan toxin atau antigen yang memicu proses inflamasi. Faktor environmental seperti iritan, polutan, radiasi UV, rokok, serta *oxygen free radicals* dapat mengaktivasi respon inflamasi pada *follicular keratinocytes* dengan adanya pelepasan IL-1 α .²³ Ketidakseimbangan protein ini mengubah fungsi seluler dan pensinyalan, yang menyebabkan, infiltrasi sel sistem imun, penebalan selubung dermal, fibrosis perifolikular, dan faktor fisiologis lainnya. Jalur pensinyalan yang diketahui terlibat dalam

regenerasi rambut.²² Pada hasil penelitian Jonathan J et.al, Kehadiran dan aktivasi STAT5 pada papila dermal dimulai selama tahap akhir perkembangan folikel rambut Mengingat deskripsi ekspresi gen STAT5 khususnya di DP, kami pertama-tama menilai aktivasinya menggunakan antibodi terhadap STAT5 total dan bentuk aktif STAT5 terfosforilasi pada posisi ini. Melalui imunopewarnaan pada bagian kulit, kami menemukan STAT5 total dan fosfo-STAT5 (P-STAT5) terbatas pada sel DP dan tidak di tempat lain di folikel rambut.⁷⁹

Semua faktor saling bergantung dan berkontribusi terhadap pembentukan lingkaran umpan balik yang kompleks. Perubahan gen pada AR kromosom Xq12 dapat menyebabkan peningkatan ekspresi reseptor ini menjadikan individu rentan terhadap AGA. Individu yang memiliki predisposisi mutasi genetik yang diwariskan menunjukkan peningkatan sensitivitas terhadap DHT dan aktivitas enzim 5 α -reduktase tipe 2 yang lebih tinggi, yang mendorong disregulasi transkripsi hilir. DHT juga memengaruhi aktivitas dari kelenjar sebacea yang mendukung lingkungan berkembangnya mikroba yang bersifat pro inflamasi.²³

Model ini menunjukkan nasib folikel rambut dalam patogenesis alopecia dan pemulihan pertumbuhan folikel rambut setelah memblokir produksi sitokin pro-inflamasi dengan MJ04 sebagai penghambat JAK3. A Menunjukkan folikel rambut yang sehat dalam fase anagen dari siklus pertumbuhan. B Menunjukkan lingkungan mikro folikel rambut yang terganggu karena infiltrasi sitokin pro-inflamasi dan sel imun selama

patogenesis alopecia. C Memblokir sinyal JAK-STAT dalam sel imun menghambat produksi sitokin pro-inflamasi yang memulihkan homeostasis di sekitar folikel rambut yang memungkinkan mereka memasuki siklus pertumbuhan baru.⁶⁴



Gambar 2.6 Gambar jalur pensinyalan JAK-STAT pada alopecia menghambat produksi sitokin inflamasi yang membantu dalam pemulihan homeostasis di sekitar folikel rambut yang diperlukan untuk masuk kembali ke fase pertumbuhan siklus rambut.⁶⁴

2.2 Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)

2.2.1 Definisi

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) adalah glikoprotein monomerik yang berfungsi sebagai sitokin, berperan penting dalam hematopoiesis dengan merangsang produksi dan diferensiasi berbagai sel darah putih, termasuk granulosit (neutrofil,

eosinofil, dan basofil) serta monosit. GM-CSF adalah sitokin pleiotropik yang membangkitkan proses kompleks selama perbaikan luka.⁷⁶

Struktur dan sumber produksi GM-CSF disekresikan oleh berbagai jenis sel, seperti makrofag, sel T, sel mast, sel pembunuh alami (NK), sel endotel, dan fibroblas. Sitokin ini berperan dalam respons imun dengan mengaktifkan dan merekrut sel-sel imun ke lokasi infeksi atau inflamasi.⁷⁶

Fungsi utama GM-CSF berperan dalam stimulasi hematopoiesis, Mendorong sel punca hematopoietik untuk berdiferensiasi menjadi granulosit dan monosit.²⁴ Aktivasi sel imun, yaitu meningkatkan aktivitas fagositik makrofag dan neutrofil, serta meningkatkan migrasi neutrofil serta peran dalam inflamasi, Terlibat dalam respons inflamasi dengan mempengaruhi produksi sitokin pro-inflamasi lainnya.⁷⁵

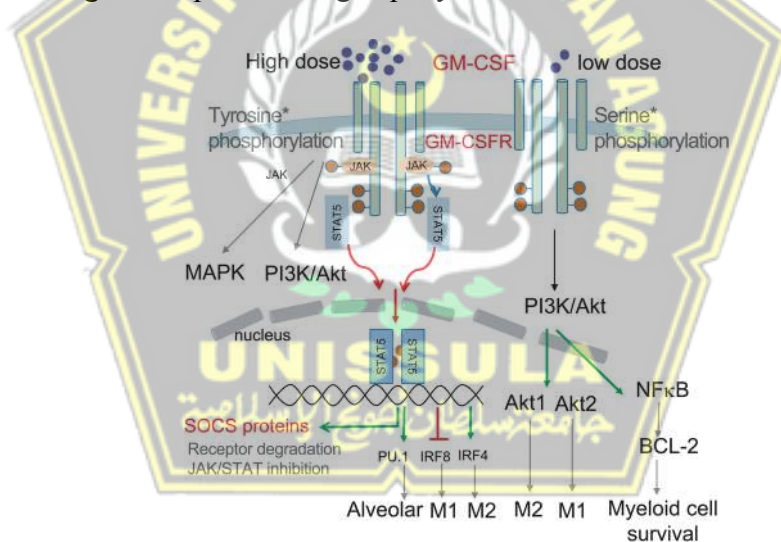
2.2.2 GM-CSF Meningkatkan dan Menekan Autoimunitas

GM-CSF dapat menginduksi DC dan makrofag untuk mengaktifkan Treg spesifik antigen dan menekan penyakit autoimun eksperimental pada tiroiditis autoimun dan GM-CSF dapat menginduksi produksi monosit dengan fungsi supresif yang meredam induksi dan keparahan penyakit dalam mode ketergantungan IRF1.⁶

2.2.2.1 GM-CSF Meningkatkan Imunitas dan Menengahi Immunopatologi Selama Infeksi

Banyak penelitian telah membuktikan bahwa GM-CSF memiliki peran yang tidak berlebihan dalam meningkatkan kekebalan anti-patogen. Sumber utama GM-CSF, sejumlah sel hematopoietik dan

nonhematopoietik telah terbukti mengeluarkan GM-CSF. Sel-sel tersebut meliputi sel T, sel pembunuh alami manusia, sel mast, monosit/MØs, sel endotel manusia, dan fibroblas manusia. Kontribusi relative dari masing-masing subset individu terhadap keseluruhan GM-CSF yang diproduksi dalam kondisi stabil atau kondisi inflamasi belum ditentukan. Di paru-paru, produksi GM-CSF oleh sel endotel dalam kondisi stabil berperan penting dalam diferensiasi MØ alveolar dari monosit janin. Dalam kondisi peradangan, seperti artritis yang diinduksi kolagen dan ensefalomielitis autoimun eksperimental (EAE), produksi GM-CSF oleh sel T dilaporkan meningkatkan perkembangan penyakit.⁶



Gambar 2.7 Gambar Skema yang mengilustrasikan bagaimana dosis GM-CSF memilih modul sinyal yang akan diaktifkan.⁶

2.2.2.2 Peran GM-CSF pada Alopecia Androgenik

Penemuan saat ini menyediakan metode untuk menumbuhkan kembali rambut pada pasien dengan Alopecia Androgenik (AGA) dengan pemberian rangkaian *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF)

atau turunannya yang efektif. Setelah keadaan tumbuh kembali diperoleh, pertumbuhan rambut dipertahankan dengan pemberian rangkaian *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* atau turunannya secara berkala. Penemuan ini selanjutnya menyediakan metode untuk meningkatkan pertumbuhan dan kepadatan kutikula menggunakan pemberian rangkaian *Granulocyte Colony Stimulating Factor* atau turunannya yang efektif secara serupa. Pertumbuhan dan kepadatan kutikula yang meningkat dipertahankan dengan pemberian rangkaian *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* atau turunannya secara berkala.²⁸ GM-CSF secara berkala terbukti mampu meningkatkan regenerasi rambut dengan mengaktifkan kembali folikel rambut yang tidak aktif. Mekanisme kerja GM-CSF memobilisasi sel progenitor hematopoietik dan memfasilitasi diferensiasinya menjadi matriks sel rambut yang aktif, memungkinkan pertumbuhan rambut baru. Pendekatan ini melibatkan pemberian kursus GM-CSF secara berulang, yang menghasilkan regenerasi rambut yang signifikan dalam beberapa bulan.⁷²

2.3 Interleukin-1 alfa (IL-1 α)

2.3.1 Definisi

IL-1 α , merupakan sitokin proinflamasi yang ada di mana-mana dan mempunyai peranan penting. Prekursor IL-1 α secara konstitutif terdapat di hampir semua jenis sel yang sehat, tetapi dilepaskan saat sel nekrotik mati sebagai mediator bioaktif. IL-1 α juga diekspresikan dengan menyusup ke sel myeloid di dalam jaringan yang cedera. Sitokin tersebut mengikat reseptor IL-1 1 (IL-1R1), seperti halnya IL-1 β , dan menginduksi efek

proinflamasi yang sama. Sebagai prekursor bioaktif yang dilepaskan saat kerusakan jaringan dan kematian sel nekrotik, IL-1 α merupakan pusat patogenesis berbagai kondisi yang ditandai dengan peradangan organ atau jaringan. Ini termasuk kondisi yang memengaruhi paru-paru dan saluran pernapasan, penyakit kulit dan kelainan kulit inflamasi, sklerosis sistemik, miokarditis, perikarditis, infark miokard, penyakit arteri koroner, trombotik inflamasi, serta kondisi multifaktorial yang kompleks seperti COVID-19, vaskulitis dan penyakit Kawasaki, sindrom Behcet, Sindrom Sjogren, dan kanker.²⁹

2.3.2 Faktor yang mempengaruhi produksi IL-1 α

IL-1 α diproduksi sebagai protein prekursor 271 asam amino (AA). Prekursor IL-1 α ditranslokasi ke dalam nukleus untuk mengikat kromatin dan juga ada dalam bentuk yang terikat pada membran. Setelah terjadi respons stres, IL-1 α diproses oleh protease calpain yang bergantung pada Ca²⁺ atau protease lain, seperti limfosit T sitotoksik (CTL)/natural killer (NK)-granzyme-B, chymase sel mast, atau elastase neutrofil ke 159 AA C-terminal sebagai IL-1 α matang. Pemrosesan IL-1 α memisahkan NLS dari prekursornya, yang tidak terkait dengan sekresi atau kematian sel; namun, IL-1 α adalah sinyal bahaya utama yang menginduksi peradangan saat dilepaskan dari sel nekrotik. Reseptor dan faktor penghambat sinyal IL-1. IL-1R1 berinteraksi dengan IL-1 α dan IL-1 β dan mendorong transduksi sinyal, bersama dengan koreseptornya IL-1R3 (IL-1RAcP). IL-1Ra adalah protein yang mengikat IL-1R1 tetapi tidak IL-1R3, dan berfungsi sebagai

penghambat sinyal IL-1. IL-1R2 adalah reseptor umpan karena tidak memiliki segmen sitoplasma. Anakinra adalah bentuk rekombinan IL-1Ra intrinsik manusia. Ia bekerja sebagai antagonis IL-1R1, dan mampu menghambat IL-1 α dan IL-1 β . Rilonacept adalah protein fusi rekombinan yang mencakup protein ekstraseluler IL-1R1 dan IL-1R3 manusia yang menyatu dengan bagian Fc dari IgG1 manusia. Ia mengikat IL-1 α dan IL-1 β dengan afinitas tinggi dan memiliki efek penghambatan jangka panjang. Canakinumab dan MABp1 adalah antibodi monoklonal terhadap IL-1 β dan IL-1 α . Mereka mengikat dan menetralkan target mereka secara spesifik.³⁰ IL-1 α dan IL-1 β adalah mediator penting dari respons inflamasi yang diketahui menginduksi kaskade pensinyalan yang bergantung pada MyD88 saat mengikat reseptor IL-1 tipe 1 (IL-1R1).³¹ IL-1 α dapat mengaktifkan pensinyalan IL-1R1 secara independen dari inflammasom, tetapi tetap mengendalikan respons sitokin lainnya.³²

2.4 *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSC)

2.4.1 Definisi

Exosome dari *mesenchymal stem cell* (MSC) adalah vesikel ekstraseluler berukuran 30-150 nm yang berperan dalam komunikasi antar sel. Mereka memiliki marker permukaan spesifik seperti CD63, CD81, dan CD9, yang digunakan untuk identifikasi dan isolasi. *Exosome* dibagi berdasarkan ukuran menjadi tiga jenis utama: *small exosome* (30-50 nm), *medium exosome* (50-100 nm), dan *large exosome* (100-150 nm). *Exosome* MSC mengandung berbagai molekul bioaktif seperti miRNA, protein, dan

lipida yang berkontribusi pada regenerasi jaringan, anti-inflamasi, dan modulasi imun, menjadikannya potensi besar dalam terapi medis.^{33,34,35}

2.4.2 Kandungan *Exosome* MSC

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

a. miRNA (*MicroRNA*)

Exosome MSC mengandung sejumlah miRNA yang diketahui mengatur ekspresi gen dan memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel. Misalnya, miRNA-218 dan miRNA-31 telah terbukti mendorong proliferasi sel dermal papilla dan merangsang pertumbuhan folikel rambut.^{36,37} Selain itu, miRNA-92a dan miRNA-146a memiliki sifat anti-inflamasi yang membantu mengurangi peradangan kulit kepala, yang sering dikaitkan dengan kerontokan rambut.^{38,39}

b. Protein dan Enzim

Exosome MSC mengandung berbagai protein dan enzim yang mendukung regenerasi jaringan dan pertumbuhan sel. Protein seperti Wnt dan PDGF berperan dalam jalur sinyal yang penting untuk siklus

pertumbuhan rambut.^{40,41} Wnt, misalnya, terlibat dalam aktivasi fase anagen folikel rambut, sementara PDGF membantu dalam regulasi siklus rambut dan mencegah apoptosis sel dermal papilla.

c. Lipida

Komponen lipida dalam *exosome* MSC juga memainkan peran dalam memodulasi respon seluler dan menjaga integritas membran sel. Lipida seperti *ceramide* dan *sphingomyelin* dapat berperan dalam proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan, yang mendukung lingkungan yang sehat untuk pertumbuhan rambut.⁴²

d. *Cytokine dan Growth Factors*

Exosome MSC mengandung berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan seperti PDGF, VEGF, dan IGF-1 yang berperan dalam angiogenesis, proliferasi sel, dan penyembuhan luka. PDGF dan VEGF khususnya membantu meningkatkan suplai darah ke folikel rambut, memberikan nutrisi dan oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan rambut. *Insulin-like Growth Factor 1* membantu merangsang pertumbuhan dan proliferasi sel dermal papilla.^{43,44}

2.4.3 Metode Isolasi *Exosome* MSC

Isolasi *exosome* dari *mesenchymal stem cell* (MSC) dari medium kultur adalah proses penting untuk mempelajari fungsi dan aplikasi terapinya. Beberapa metode isolasi telah dikembangkan untuk memastikan

kemurnian dan integritas *exosome* yang diisolasi. Berikut adalah beberapa metode yang umum digunakan:

a. Ultrasentrifugasi Diferensial

Metode ini adalah yang paling umum digunakan untuk isolasi *exosome*. Proses ini melibatkan beberapa tahap sentrifugasi pada kecepatan yang berbeda untuk menghilangkan sel, debris seluler, dan partikel-partikel yang lebih besar. Pertama, medium kultur disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk menghilangkan sel-sel dan debris besar. Supernatan kemudian disentrifugasi pada kecepatan lebih tinggi untuk mengendapkan mikrovesikel dan partikel yang lebih besar dari *exosome*. Akhirnya, supernatan disentrifugasi pada kecepatan sangat tinggi ($100,000-120,000 \times g$) untuk mengendapkan *exosome*. *Pellet exosome* kemudian dicuci dan disentrifugasi ulang untuk meningkatkan kemurnian.⁴⁵

b. Ultrafiltrasi

Metode ini menggunakan membran filter dengan ukuran pori tertentu untuk memisahkan *exosome* berdasarkan ukuran. Medium kultur difiltrasi melalui membran untuk menghilangkan partikel yang lebih besar dan molekul kecil, sementara *exosome* tertahan di membran. Ultrafiltrasi sering digunakan sebagai langkah tambahan setelah ultracentrifugasi untuk meningkatkan kemurnian *exosome*.⁴⁵

c. Kromatografi Afinitas

Metode ini memanfaatkan interaksi spesifik antara molekul di permukaan *exosome* dengan ligan yang terikat pada matriks kromatografi. Antibodi yang spesifik terhadap marker permukaan *exosome* seperti CD63, CD81, dan CD9 sering digunakan. Medium kultur dilewatkan melalui kolom yang mengandung ligan ini, sehingga *exosome* yang mengandung marker permukaan yang sesuai akan terperangkap dan kemudian dilusi.⁴⁵

d. Presipitasi Polimer

Metode ini melibatkan penggunaan polimer, seperti *polyethylene glycol* (PEG), yang menginduksi presipitasi *exosome* dari medium kultur. Polimer ini ditambahkan ke medium kultur dan diinkubasi, kemudian campuran disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk mengendapkan *exosome*. Metode ini relatif cepat dan sederhana, namun bisa menghasilkan eksosom dengan kemurnian yang lebih rendah dibandingkan metode lain.⁴⁵

e. Isolasi Berdasarkan Densitas

Metode ini melibatkan penggunaan gradien densitas, seperti *gradien sucrose* atau *iodixanol*, untuk memisahkan *exosome* berdasarkan densitas mereka. Medium kultur ditempatkan pada gradien densitas dan disentrifugasi pada kecepatan tinggi. *Exosome* akan terpisah pada lapisan yang sesuai dengan densitas mereka, yang kemudian dapat diambil secara terpisah.⁴⁵

2.4.4 Hipoksia

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

2.5 Efek *Exosome hypoxia mesenchymal stem cell* lewat jalur JAK-STAT terhadap ekspresi GM-CSF dan IL-1 α pada Alopecia Androgenik

Penemuan eksosom, yang merupakan zat vesikular yang disekresikan oleh sel dengan diameter sekitar 30–150 nm, menawarkan potensi terapeutik baru. Mereka telah diketahui memainkan peran penting dalam pertukaran sinyal antarsel dan memiliki potensi untuk menyegarkan sel penerima. Ini bisa menjadi solusi potensial untuk akar penyebab masalah kerontokan rambut.⁴⁶ Sifat pluripoten sel punca mendasari potensinya yang besar untuk pengobatan alopecia androgenik (AGA). Aktivasi granulosit trombosit melepaskan lebih dari 20 faktor pertumbuhan dan sitokin yang berbeda, yang penting dalam mendorong proliferasi dan diferensiasi sel. Ini termasuk faktor perangsang koloni granulosit-makrofag (GM-CSF).⁴⁷ Selain itu, Aktivasi protein STAT5 di papila dermal (DP) berperan penting dalam menginisiasi fase pertumbuhan (anagen) pada siklus folikel rambut pascanatal. Penghapusan gen STAT5 secara spesifik di DP menyebabkan

keterlambatan signifikan dalam masuknya fase anagen dan penurunan ekspresi gen-gen kunci seperti Wnt6, FGF7, FGF10, dan TNF- α yang penting dalam morfogenesis rambut. Aktivasi STAT5 diidentifikasi sebagai pengalih molekuler dari fase istirahat (telogen) ke fase pertumbuhan, menjadikannya target potensial untuk terapi gangguan rambut.⁷⁹ JAK Inhibitor (topikal atau sistemik) menjadi terapi potensial untuk AGA.

Alopecia androgenik (AGA) merupakan bentuk kerontokan rambut yang paling umum, terutama disebabkan oleh aktivasi berlebihan reseptor androgen di folikel rambut oleh dihidrotestosteron. AGA dapat secara substansial memengaruhi kesejahteraan psikologis dan kualitas hidup. Eksosom yang berasal dari sel punca, yang menunjukkan fungsi yang mirip dengan sel punca itu sendiri, telah menunjukkan peran terapeutik yang mujarab dalam berbagai model patologis, memiliki keunggulan khusus dibandingkan terapi sel dalam memperbaiki folikel rambut yang rusak dan meningkatkan pertumbuhan kembali folikel.⁴⁹ Di antara berbagai sitokin yang terkait, interleukin-1 alfa (IL-1 α) memiliki efek penghambatan pada folikel rambut dan berperan aktif dalam AGA.⁵⁰

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Faktor genetik dan usia mempengaruhi mekanisme androgen, menyebabkan rambut vellus menjadi rambut terminal yang lebih panjang, tebal, dan gelap serta cacat pada mekanisme ini memungkinkannya berfungsi secara berbeda dengan merangsang folikel rambut untuk berdegenerasi menjadi rambut vellus.

Alopecia androgenetik (AGA) adalah kondisi yang ditandai oleh kerontokan rambut progresif yang dipengaruhi oleh faktor genetik dan hormonal.⁵¹ Testosteron meningkatkan laju metabolisme, dan testosteron tingkat tinggi diperlukan untuk produksi perhiasan seksual, yang mengubah keseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan antioksidan, yang menyebabkan peningkatan risiko stres oksidatif pada sel folikel rambut.⁵² Kelebihan ROS merusak komponen seluler penting seperti DNA, protein, dan lipid, yang pada akhirnya mengganggu fungsi normal folikel rambut dan memulai proses inflamasi.⁵³

Pada alopecia androgenik, dihidrotestosteron (DHT) menstimulasi sekresi faktor penghambat pertumbuhan rambut, seperti transforming growth factor $\beta 1$ dan 2 (TGF- $\beta 1/p2$). Penyebab utama dari proses ini adalah stres oksidatif dan akumulasi spesies oksigen reaktif (ROS) secara bertahap di dalam sel, yang mengakibatkan hilangnya fungsinya. Dimana

ROS memediasi respons terhadap DHT dan faktor pertumbuhan, yang pada gilirannya dapat memengaruhi pensinyalan faktor pertumbuhan di dalam sel.⁵⁴

Hormon memainkan peran penting dalam regulasi siklus rambut dan dapat mempercepat penuaan rambut. Androgen, terutama dihidrotestosteron (DHT), memengaruhi folikel rambut (HF) dengan berikatan dengan reseptor androgen (AR) di dalam sel folikel. DHT memiliki afinitas 5-10 kali lebih tinggi terhadap AR dibandingkan testosteron. Pada pasien kebotakan pola pria (MPHL), 5 α -reduktase dan DHT ditemukan meningkat secara abnormal, menyebabkan overaktivasi sinyal AR. Sinyal AR yang berlebihan meningkatkan ekspresi protein terkait dickkopf 1 (DKK-1), penghambat sinyal WNT, IL-6, dan transforming growth factor-beta (TGF- β), yang menghambat pertumbuhan rambut dan transisi telogen ke anagen. AR juga menginduksi regresi pembuluh darah di sekitar papila dermal, yang penting untuk inisiasi anagen. Selain itu, DHT juga dapat meningkatkan akumulasi ROS mitokondria (mtROS) di sel papila dermal, menyebabkan penuaan pada sel papilla dermal.⁸⁴

ROS sangat penting dalam memediasi beberapa aspek imunitas yang dimediasi limfosit T hilir dari pensinyalan TCR termasuk proliferasi sel T, fungsi efektor, dan kematian.⁵⁵ ROS diaktifkan lewat IkBa dan menghambat persinggahan NF- κ B juga dapat menginduksi apoptosis.

Aktivasi berlebihan jalur IKK/NF- κ B ditemukan dalam berbagai kondisi patologis, seperti penyakit inflamasi kronis, dan alopecia androgenetik.⁶¹

NF- κ B dan IKK dapat saling berinteraksi dalam jalur inflamasi serta mengatur ekspresi gen yang berperan penting dalam proses apoptosis.

IKK terfosforilasi (p-IKK) mengaktifkan penghambat NF- κ B, alfa (IkB α) ke dalam fase fosforilasi. IkB α terfosforilasi kemudian dibikuitinasi dan didegradasi oleh proteasom dan NF- κ B aktif dilepaskan. NF- κ B bertranslokasi ke nukleus, tempat ia mengaktifkan produksi gen proinflamasi dan proapoptotik. Pada kondrosit OA mencit, natrium ferulat (SF) menghambat jalur apoptosis kaskade kaspase dan jalur IKK/NF- κ B yang diinduksi oleh kombinasi TNF/TNFR. COX-2, siklooksigenase-2; NO, oksida nitrat; PGE2, prostaglandin E2; TRAF, faktor terkait reseptor TNF.⁶⁸

Kompleks IKK terdiri dari tiga subunit utama yaitu IKK α , IKK β , dan IKK γ (juga dikenal sebagai NEMO). Peran utama IKK yaitu fosforilasi IkB. IKK memfosforilasi IkB pada dua residu serin spesifik (Ser32 dan Ser36). Fosforilasi ini menandai IkB untuk degradasi oleh proteasom, yang membebaskan NF- κ B dari kompleksnya dengan IkB.⁵⁹ Translokasi NF- κ B ke Nukleus, setelah IkB terdegradasi, NF- κ B menjadi aktif dan ditranslokasikan ke nukleus untuk menginduksi ekspresi gen target, termasuk gen yang terlibat dalam peradangan (pro-inflamasi), imun, dan apoptosis.⁶⁰

Caspase-8 mengaktifkan caspase-3, yang merupakan kaspase eksekutor utama dalam apoptosis. Caspase-8 dan caspase-3 berperan penting dalam apoptosis, yang merupakan proses kematian sel. Kaspase eksekutor aktif membelah substrat kematian, yang akhirnya mengakibatkan apoptosis. Yang lainnya adalah penghambat jalur kinase NF- κ B (IKK)/NF- κ B, yang mengaktifkan IKK sitoplasma. Caspase 8 dan caspase 3 terkait dengan jalur apoptosis, yang bisa diinduksi oleh berbagai faktor seperti infeksi atau stres sel.

Exosome yang dihasilkan oleh MSC memiliki peran krusial dalam mengatur proses alopecia melalui berbagai protein dan miRNA yang terkandung di dalamnya. Protein seperti faktor pertumbuhan *fibroblast* (FGF), faktor pertumbuhan epidermal (EGF), dan *insulin-like growth factor* (IGF) membantu dalam merangsang proliferasi sel-sel folikel rambut serta memperbaiki kerusakan jaringan di kulit kepala. Sementara itu, miRNA seperti miRNA-92a dan miRNA-146a berperan dalam mengurangi peradangan dan mempengaruhi respons imun di daerah kulit kepala yang terkena alopecia.^{63,64} miRNA-221/222 berperan dalam mengatur siklus pertumbuhan rambut dengan memodulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi sel-sel folikel rambut.⁶⁵ Secara keseluruhan, kombinasi protein dan miRNA yang terdapat dalam exosome MSC bekerja sinergis untuk mempengaruhi berbagai aspek alopecia, baik melalui pengaturan peradangan, regenerasi jaringan, maupun regulasi siklus pertumbuhan rambut secara langsung. Pemahaman mendalam

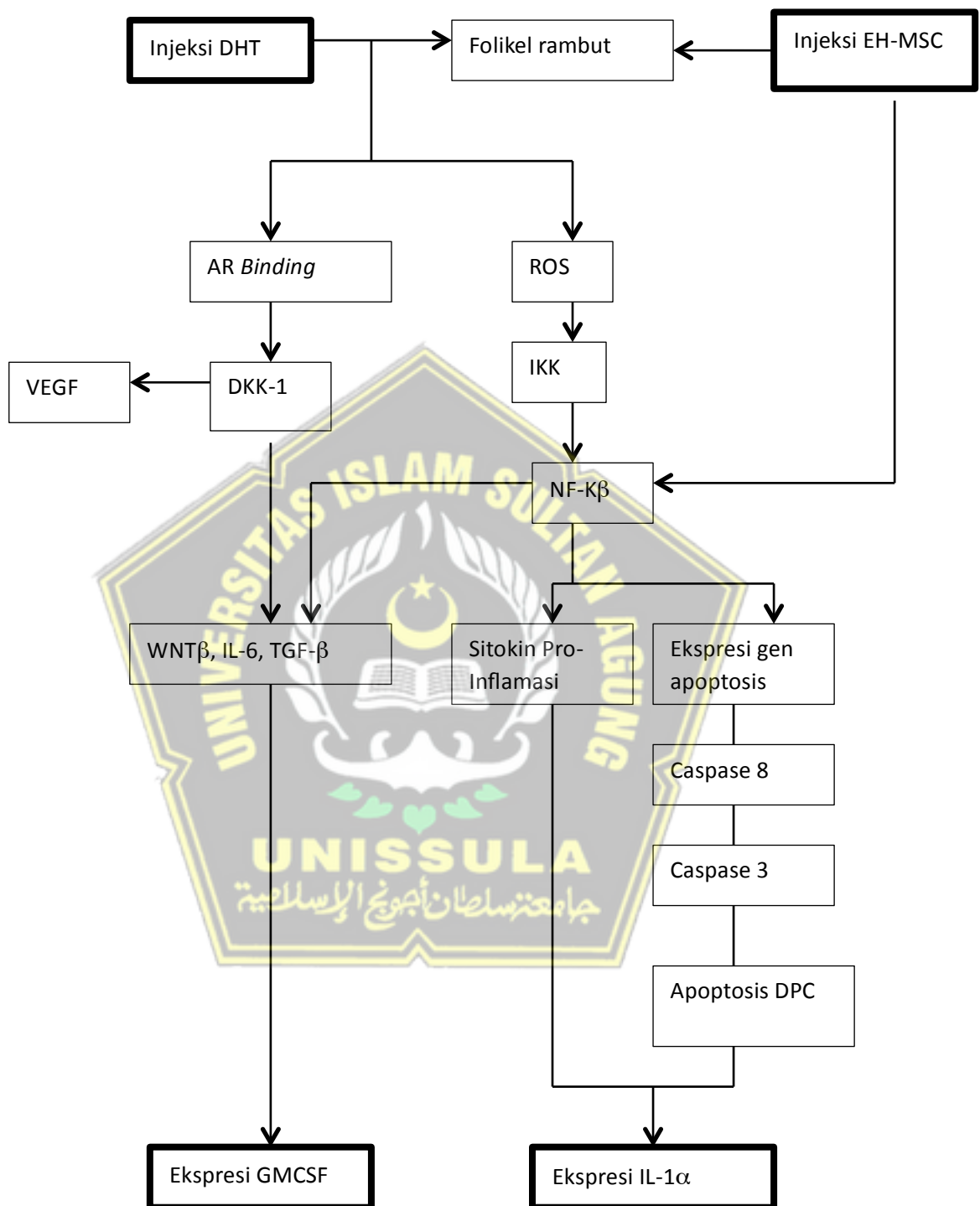
terhadap mekanisme ini penting untuk mengembangkan terapi yang lebih efektif dalam mengatasi masalah kerontokan rambut yang disebabkan oleh alopecia.⁶⁶ Eksosom dapat membawa JAK-STAT atau molekul yang memodulasi aktivitas JAK-STAT dalam jalur Wnt, yang penting dalam pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi sel. Eksosom yang mengandung IL-1 α dapat memicu respons inflamasi di sel target, yang dapat melibatkan aktivasi jalur NF-kB dan proses-proses lain yang terkait dengan peradangan atau penyembuhan. Eksosom yang membawa GM-CSF dapat mempengaruhi diferensiasi dan aktivasi sel-sel imun, mendukung respons imun terhadap infeksi atau cedera. Secara keseluruhan, eksosom berfungsi sebagai penghubung molekuler yang dapat membawa JAK-STAT, IL-1 α , dan GM-CSF untuk memodulasi berbagai proses biologis, termasuk inflamasi, pertumbuhan sel, dan regulasi respons imun.

IL-1 α dan IL-1 β memiliki efek paling mendalam, menghasilkan peningkatan pertumbuhan sel. Khususnya, respons IL-1 α dan IL-1 β mengelompok dengan respons GM-CSF dan IL-3, dua sitokin terkait pertumbuhan lainnya, yang menunjukkan peran IL-1 sebagai mediator utama pertumbuhan pada AML.⁶²

Inhibitor Janus kinase (Jak)-Stat AG490 menghentikan ekspresi prokaspase 3 dan aktivasi kaspase 3 yang diinduksi GM-CSF.⁷² GM-CSF diketahui dapat memodulasi proses apoptosis, yang mempengaruhi bagaimana sel-sel sistem imun bereaksi terhadap stimulus. Pada beberapa kasus, GM-CSF dapat bertindak untuk mengurangi apoptosis, khususnya

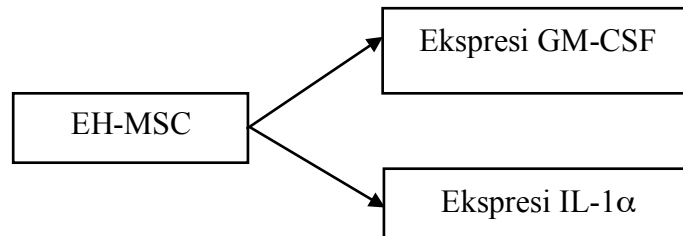
pada sel-sel imun seperti neutrofil dan makrofag, yang memungkinkan mereka untuk bertahan lebih lama dan meningkatkan respons imun. GM-CSF mungkin juga mempengaruhi ekspresi atau aktivasi protein caspase dalam sel-sel imun. Interaksi antara sitokin seperti GM-CSF dan jalur apoptosis dapat mempengaruhi keseimbangan antara kelangsungan hidup dan kematian sel dalam respons imun, yang dapat berkontribusi pada hasil dari infeksi atau peradangan. Meskipun hubungan langsung antara GM-CSF dan caspase 3 lebih kompleks, GM-CSF dapat berperan dalam mengatur proses apoptosis, yang melibatkan caspase 3, dalam konteks sistem imun dan peradangan.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

- 3.3.1. Terdapat pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap Ekspresi GM-CSF dan IL-1 α pada Mencit C57BL6 yang diinduksi DHT.

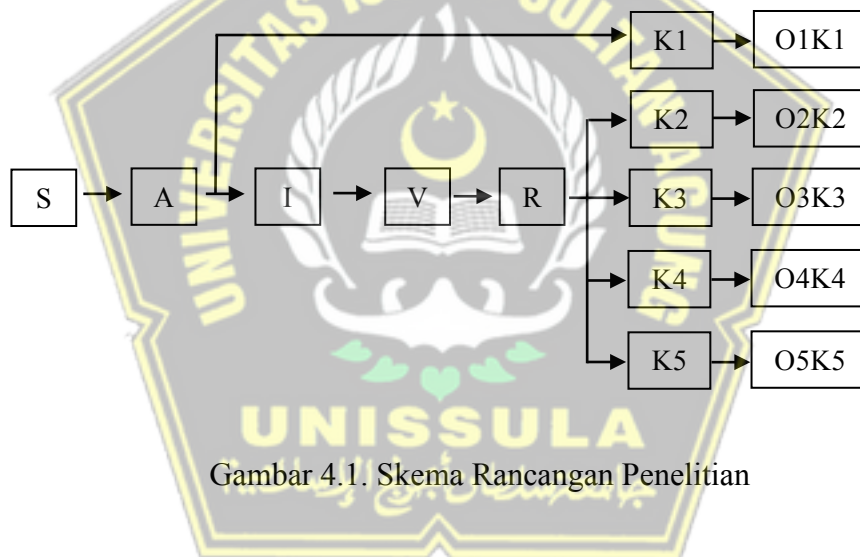


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S = Sampel

A = Aklimatisasi hewan coba

I = Induksi DHT

V = Validasi

R = Randomisasi hewan coba

K1 = Mencit C57BL6 sehat, tidak diberi perlakuan

K2 = Mencit C57BL6 diinduksi DHT dengan diberi NaCl 0,9%

K3 = Mencit C57BL6 diinduksi DHT dengan diberi Minoxidil 5%

K4 = Mencit C57BL6 s diinduksi DHT dengan diberi *Exosome hypoxia* MSC
100 µg/kgBB

K5 = Mencit C57BL6 diinduksi DHT dengan diberi *Exosome hypoxia* MSC
200 µg/kgBB

O1K1 = Observasi Ekspresi GM-CSF dan IL-1α kelompok K1

O2K2 = Observasi Ekspresi GM-CSF dan IL-1α kelompok K2

O3K3 = Observasi Ekspresi GM-CSF dan IL-1α kelompok K3

O4K4 = Observasi Ekspresi GM-CSF dan IL-1α kelompok K4

O5K5 = Observasi Ekspresi GM-CSF dan IL-1α kelompok K5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel penelitian

- Variabel Bebas penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Exosome hypoxia* MSC
- Variabel Tergantung penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekspresi GM-CSF dan IL-1α
- Variabel Prakondisi penelitian ini adalah pemberian Dihidrotestosteron secara injeksi.

4.2.2 Definisi Operasional

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

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

Skala: Ordinal

b. Ekspresi GM-CSF

Sampel diambil dari kulit mencit C57BL6 yang diberikan perlakuan injeksi EH-MSC. Sampel kulit mencit C57BL6 tersebut diukur menggunakan teknik PCR (*Polymerase chain reaction*) untuk diketahui eksresi dari GM-CSF.

Skala: Rasio

c. Ekspresi IL-1 α

Sampel diambil dari kulit mencit C57BL6 yang diberikan perlakuan injeksi EH-MSC. Sampel kulit mencit C57BL6 tersebut diukur menggunakan teknik PCR (*Polymerase chain reaction*) untuk diketahui ekspresi dari IL-1 α .

Skala: Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek penelitian

Mencit C57BL6 berusia 6-8 minggu dengan berat 20-25 gram dipilih untuk penelitian ini setelah dianggap layak oleh dokter hewan dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia. Mencit C57BL6 dipelihara di lab berventilasi cukup dan suhu ruangan 20-28°C dengan makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria inklusi

- a. Mencit C57BL6 yang tidak memiliki kelainan anatomi.
- b. Jenis kelamin jantan
- c. Usia 6-8 minggu
- d. Berat badan 20-25 g

4.3.2.2. Kriteria eksklusi

- a. Mencit C57BL6 yang diinjeksikan DHT tidak mengalami *Alopecia*.
- b. Mencit C57BL6 yang sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
- c. Mencit C57BL6 yang sakit selama masa penelitian.

4.4. Besar Sampel

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

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

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

Berdasarkan perhitungan tersebut, penelitian menggunakan lima ekor sampel per perlakuan. Untuk menghadapi risiko mortalitas pada mencit C57BL6, setiap kelompok ditambah sampel sebanyak satu ekor dari jumlah hitungan menjadi total enam ekor per perlakuan. Dengan demikian, jumlah total sampel yang digunakan adalah 30 ekor serta 4 sampel tambahan digunakan untuk validasi, sehingga total 34 mencit C57BL6.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat Penelitian

Peralatan kultur sel, termasuk Biosafety Cabinet (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, peralatan bedah, dan labu 25T, dipergunakan pada saat ini. Ruang hipoksia dipergunakan menciptakan kondisi yang diperlukan untuk kultur hipoksia. Konsentrasi oksigen di ruang hipoksia diukur menggunakan pengukur oksigen. Selain itu, penyeka steril dipergunakan pada riset ini injeksi EH-MSCs dan Dihidrotestosteron dipergunakan dalam menginduksi gejala mirip alopecia-androgenik. Instrumen guna menganalisis ekspresi gen GM-CSF dan IL-1 α .

4.5.2. Bahan Penelitian

Bahan kultur yang dipergunakan pada riset ini antara lain tali pusar mencit C57BL6, NaCl 0,9%, DMEM, FBS, PBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan alkohol 70%, PBS, Xylasine, ketamine, dan gel berbahan dasar air menjadi bahan yang dipergunakan dalam proses pengobatan.

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. *Ethical clearance*

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

4.6.2. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem 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 mencit C57BL6 dipotong dan pembuluh darahnya dibuang
- d. Setelah *umbilical cord* dicincang halus, diletakkan secara merata didalam labu 25T dan diamkan selama tiga menit agar tisu menempel pada permukaan labu
- e. Media (DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan sedikit demi sedikit hingga jaringan tertutup
- f. Eksplan disimpan dalam inkubator dengan 5% CO₂ pada suhu 37°C
- g. Setelah prosedur kultur dimulai, sel akan berkembang setelah sekitar 14 hari
- h. Setiap tiga hari, media diganti dengan cara membuang setengahnya dan menambahkan yang baru dan penuh sebagai gantinya
- i. Pemeliharaan sel berlanjut hingga 80% sel konfluensi.

4.6.3. Proses Hipoksia

- a. MSCs dengan konfluensi 80% dimasukkan, dan ditambahkan hingga 10 mL media penuh
- b. Selanjutnya *flask* yang mengandung MSCs ditempatkan di

dalam ruang hipoksia

- c. Dalam mengukur jumlah oksigen dalam ruangan, gas nitrogen dialirkan melalui katup inlet dan pengukur oksigen ditempatkan pada lubang sensor
- d. Nitrogen disuntikkan sampai oksigen 5% ditunjukkan oleh jarum indikator
- e. *Chamber* yang telah diisi flask diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- f. Media kultur dikeluarkan setelah 24 jam dan diisolasi dengan metode TFF untuk menghasilkan EH-MSCs.

4.6.4. Pembuatan *Exosome* Hipoksia MSCs

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



Gambar 4.2. Isolasi MSC dan Pembuatan *Exosome*

4.6.5. Pembuatan alopesia dan pemberian perlakuan pada subjek percobaan

- a. Setelah satu minggu adaptasi, mencit C57BL6 diberikan kombinasi *xylazine* (20 mg/kgbb) dan ketamine (60 mg/kgbb) untuk menginduksi anestesi.

- b. Mencukur rambut pada mencit C57BL6
- c. Mencit C57BL6 kelompok K1 tidak di berikan treatmen apapun. Mencit C57BL6 kelompok K2 sampai dengan K5 diberikan Dihidrotestosteron 1 mg/hari selama 17 hari
- d. Hari ke-25 dilakukan validasi
- e. Dilakukan injeksi peritoneal pada Mencit C57BL6. Injeksi NaCL dilakukan pada K2, Topikal Minoxidil 5% pada K3, injeksi *Exosome* hipoksia MSC dosis 100µg/kgbb hari ke 25 dan ke 32 sebanyak 2x (interval) pada K4, dan Injeksi *Exosome* hipoksia MSC dosis 200µg/kgbb hari ke 25 dan hari ke 32 sebanyak 2x (interval) pada K5
- f. Hari ke-39 dilakukan pemeriksaan sampel
- g. Jaringan yang telah dihomogenisasi disimpan dalam -80°C hingga proses analisis.
- h. Periksa Ekspresi GM-CSF dan IL-1 α menggunakan PCR sesuai protokol pabrik.

4.6.6. Metode Validasi

- a. Validasi secara makroskopis pada hari ke-25 dimana dinyatakan positif jika daerah yang dicukur tidak menunjukkan pertumbuhan rambut kembali
- b. Validasi mikroskopis dengan pewarnaan *Hematoksin-Eosin* (HE) dimana dinyatakan mengalami alopecia jika tidak ditemukan folikel dalam fase anagen pada kulit mencit C57BL6. Untuk melakukan validasi mikroskopis dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Sampel kulit diperoleh dari masing-masing kelompok dan digunakan untuk membuat potongan histologis menggunakan pewarnaan HE dan teknik paraffin Sampel kulit mencit C57BL6 diperoleh dari masing-masing kelompok dan diawetkan dalam larutan NBF 10% atau *Neutral Buffer Formalin*
2. Sampel kulit dibersihkan dari sisa larutan fiksatif dengan membilasnya menggunakan alkohol 70%
3. Sampel ditandai dan ditempatkan dalam keranjang tisu setelah difiksasi dalam larutan BNF 10
4. Alkohol absolut dan alkohol bergradasi 70, 80%, 90%, dan 96% digunakan untuk mendehidrasi sampel jaringan
5. Sampel dimasukkan ke dalam toluol selama satu jam, atau hingga menjadi bening atau transparan
6. Sampel kemudian diinfiltrasi menggunakan parafin dalam oven bersuhu 56°C. Caranya dengan memasukkannya ke dalam kombinasi toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Masing-masing selama tiga puluh menit, sampel kulit direndam dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III
7. Kemudian sampel ditanam (*embedding*) dalam parafin dan *blocking* ditunggu hingga paraffin mengeras
8. Dengan menggunakan mikrotom, potong blok jaringan menjadi irisan berukuran 6µm. Kemudian letakkan potongan-potongan tersebut di atas permukaan kaca yang telah dilapisi perekat *Mayer Albumin*, ditetesi

sedikit air suling, dan dipanaskan di atas *hot plate* hingga menempel sempurna

9. Sebelum pewarnaan jaringan, parafin dihilangkan (*deparaffinisasi*) dengan xylol selama sehari penuh
10. Pewarna HE digunakan untuk pewarnaan. Kertas kering digunakan untuk menyerap kandungan *xylol*, yang kemudian secara bertahap ditambahkan ke air sulingan dan larutan alkohol dengan persentase yang semakin rendah (96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30%), masing-masing, untuk durasi 1- 2 menit
11. Setelah jaringan diwarnai selama 5–10 detik dengan hematoksilin, jaringan dibilas lagi selama 10 menit dengan air mengalir
12. Selama 3-5 menit, preparata direndam dalam alkohol masing- masing 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%
13. Selanjutnya jaringan diwarnai dengan pewarnaan eosin selama 2 menit. Kemudian dikeringkan dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam larutan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, dan 96%) masing-masing selama 3-5 menit
14. Setelah 15 menit *clearing xylol*, balsam Kanada ditetaskan ke dalam sediaan histologi
15. Memasang *slide* jaringan dengan kaca penutup, memberi label, dan memasukkannya ke dalam kotak sediaan melengkapi prosedur ini.

4.6.7. Terminasi dan pengambilan jaringan

- a. Sebelum mengeluarkan organnya, matikan mencit C57BL6 dengan dosis koktail yang mematikan. *Ketamine* 60 mg/kgBB dan *Xylazine* 20 mg/kgBB diperlukan untuk membuat 10 mL *cocktail*
- b. Organ kulit diambil dari bangkai mencit C57BL6 dan diawetkan dalam RNA *later* pada suhu -80°C dalam *cryotube* bebas RNAase.

4.6.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

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

menit.

- f. Supernatant kemudian dibuang dan pellet ditambahkan dengan 1 mL 75% ethanol lalu diresuspensi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7500 x g di suhu 4°C selama 5 menit.
- g. Supernatant kemudian dibuang dan pellet RNA ditambahkan dengan 50 uL *nuclease-free water* (NFW).
- h. Konsentrasi sampel RNA kemudian dikuantifikasi menggunakan *uDrop microplate reader*.
- i. Sampel RNA sebanyak 0.1 ug dalam 1 uL kemudian ditambahkan 5 uL NFW dan dilakukan proses denaturasi dengan inkubasi di suhu 65°C selama 5 menit menggunakan *thermal cyclers*.
- j. Selama 5 menit dengan memanfaatkan *thermal cyclers* sampel RNA kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C lalu ditambahkan 2 uL 4x DN *Master Mix*.
- k. Selanjutnya ditambahkan 2 µg 5x RT *Master Mix*, dan *thermal cyclers* dimanfaatkan guna menginkubasi campuran pada suhu 37°C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit, dan 98°C selama 5 menit.
- l. Sampel cDNA kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

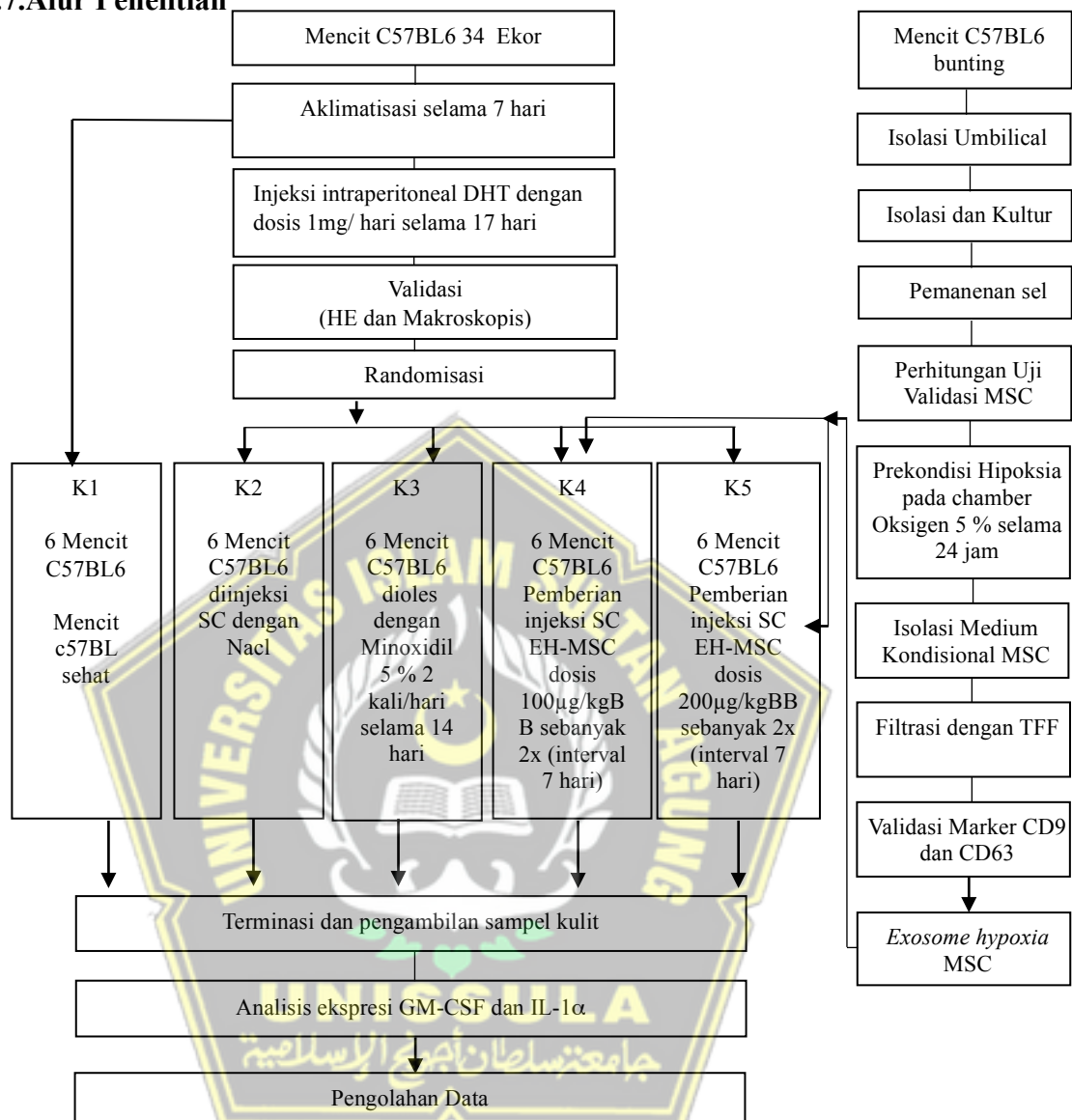
4.6.9. Pembacaan GM-CSF/IL-1α dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

- a. Dengan menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR), ekspresi gen GM-CSF dan IL-1α dianalisis.

- b. Lalu proses mencampuran 1 μ G cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix sebanyak 10 μ G, forward primer sebanyak 0.8 uL, reverse primer sebanyak 0.8 uL dan NFW 7.4 sebanyak uL.
- c. Primer GM-CSF yang digunakan dan Primer IL-1 α yang digunakan
- d. Proses qPCR dilakukan menggunakan suhu 95°C selama 2 menit, 95°C selama 5 detik dan 56°C selama 20 detik sebanyak 40 siklus. Proses qPCR dilakukan dengan menganalisis probe terhidrolisis pada panjang gelombang 520 nm.
- e. Dengan *Software EcoStudy* kuantifikasi data qPCR dilakukan.



4.7. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

4.8. Analisa Data

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

Hasil penelitian rerata ekspresi IL-1 α dilakukan menggunakan uji normalitas dengan uji Shapiro-Wilk, didapatkan data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas pada ekspresi IL-1 α dilakukan dengan Levene's Test didapatkan hasil yang homogen ($p > 0,05$). Uji One Way ANOVA dilakukan pada rerata ekspresi IL-1 α dan didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$). Uji Post Hoc LSD diterapkan untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.

4.9.Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni hingga Juli 2025 di Laboratorium Animal Model Research Center SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*).



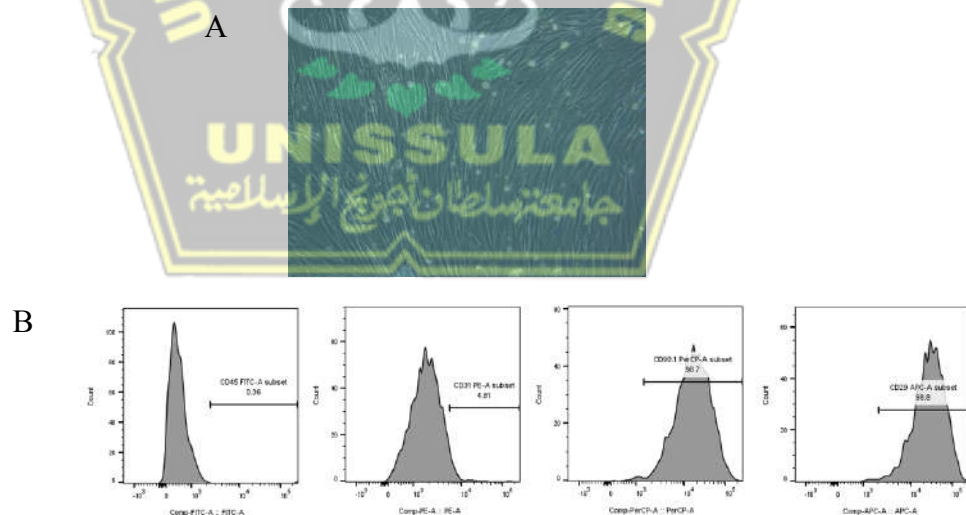
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

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

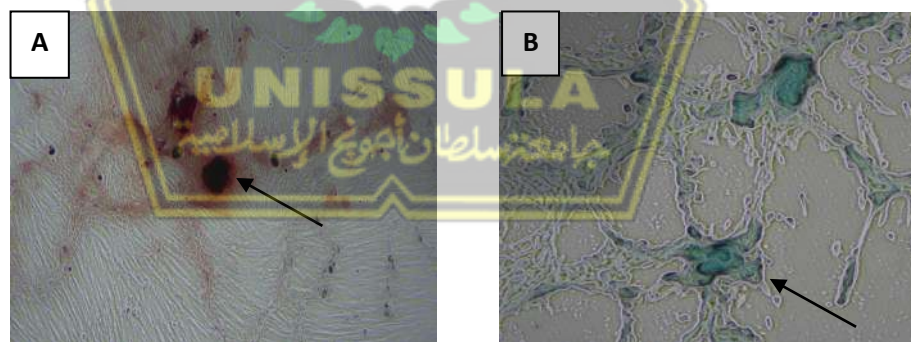
Mesenchymal stem cell diisolasi di Laboratorium SCCR Indonesia di Semarang, menggunakan sumber berupa tali pusat mencit pada usia berusia 21 hari kehamilan. Setelah proses isolasi, sel-sel tersebut dikultur dalam *Flask* kultur yang berisi media DMEM. Setelah mencapai pasase kelima, analisis morfologi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



Gambar 5.1. Morfologi MSC. (A) morfologi MSC berbentuk fibroblas-like. (B) Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90, dan CD29.

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

Penelitian ini juga memastikan kapasitas MSC dalam diferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa seperti sel osteogenik dan sel kondrosit yaitu dengan cara memberi medium spesifik menginduksi diferensiasi, baik menjadi osteogenik maupun kondrosit. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa MSC mampu mengalami diferensiasi menjadi osteogenik dan kondrosit yang terlihat oleh Alizarin-red staining dan Alician Blue Staining. (Gambar 5.2 A dan B).



Gambar 5.2. Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteogenik pada pewarna Alizarin-red staining dan (ditunjukkan dengan panah hitam, perbesaran 200x). (B) Kondrosit pada pewarnaan Alician Blue Staining (ditunjukkan dengan panah hitam, perbesaran 100x).

Setelah tervalidasi, MSC kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam menggunakan box hipoksia. Setelah itu, medium kultur MSC yang mengandung sekretom MSC dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode TFF dengan ukuran 100-500 kDa sehingga dapat diperoleh EH-MSC. Setelah diisolasi kadar *exosome* dianalisis menggunakan metode *flowcytometry* dan didapatkan bahwa kadar *exosome* yang didapatkan sebesar 8 ug/100 uL = 80 ug/mL (Gambar 5.3).



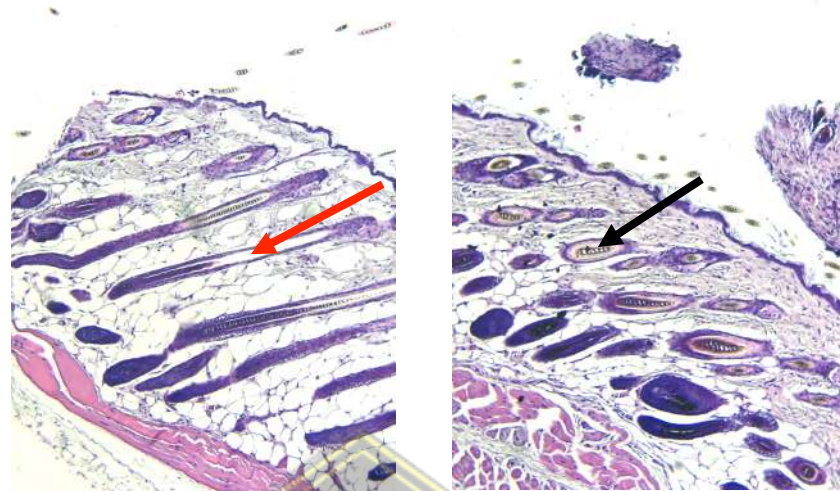
Gambar 5.3. Hasil Analisis Kadar *Exosome* menggunakan marker CD63 dan CD9

5.1.2. Hasil Validasi Alopecia Androgenik

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

	Setelah aklimatisasi	1 minggu setelah DHT	Hari ke 5 setelah perlakuan	Hari ke 14 setelah perlakuan
K1				
K2				
K3				
K4				
K5				

Gambar 5.4. Validasi makroskopis mencit sebelum dan setelah perlakuan



Sehat

Alopecia AGA

Gambar 5.5. Hasil mikroskopis pasca pemberian EH-MSCs

Setelah mencit tervalidasi mengalami Alopecia androgenik, mencit yang tanpa induksi DHT digunakan sebagai kontrol sehat (K1), sedangkan mencit yang mengalami Alopecia androgenik akibat induksi DHT dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara acak yaitu K2 (mencit Alopecia androgenik dengan diinjeksi dengan NaCl) K3 (mencit Alopecia androgenik dengan dioles dengan Minoxidil 5 %), K4 dan K5 (mencit Alopecia androgenik dengan injeksi EH-MSc dengan dosis masing-masing 100 μg dan 200 μg secara subkutan).

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

jaringan terhomogenisasi menjadi suspensi, proses sentrifugasi dilakukan, dan supernatan dikumpulkan untuk analisis ekspresi GM-CSF dan IL-1 α menggunakan metode PCR.

5.1.3. Ekspresi GM-CSF

Data ekspresi GM-CSF dari lima kelompok (K1 hingga K5) menunjukkan variasi yang signifikan dalam konsentrasi. Kelompok K5 memiliki ekspresi tertinggi, yaitu $3,42 \pm 0,31$ pg/mL, diikuti K4 dengan $2,91 \pm 1,01$ pg/mL. Kelompok K3 memiliki ekspresi yang lebih rendah sebesar $1,02 \pm 0,48$ pg/mL dan K1 $1,01 \pm 0,15$ pg/mL, sementara ekspresi terendah ditemukan pada K2 dengan $0,43 \pm 0,12$ pg/mL.

Tabel 5.1, Data Hasil Analisis Ekspresi GM-CSF

Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	
GM-CSF	1,01 $\pm$ 0,15	0,43 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,48	2,91 $\pm$ 1,01	3,42 $\pm$ 0,31	
Shapiro Wilk	0,79	0,29	0,23	0,50	0,15	
Lavene test						0,00
One Way Anova						0,000

Uji statistik Shapiro-Wilk yang dilakukan untuk mengevaluasi distribusi data menunjukkan bahwa data ekspresi GM-CSF pada semua kelompok memiliki distribusi normal ($p > 0,05$). Namun, analisis homogenitas varians menggunakan Levene test menunjukkan bahwa varians data antar kelompok tidak homogen ($p < 0,05$). Hasil analisis ini kemudian dilanjutkan dengan analisis perbedaan ekspresi GM-CSF antar

kelompok dilakukan menggunakan One-Way ANOVA, yang memberikan hasil signifikan secara statistik ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekspresi GM-CSF antar kelompok.

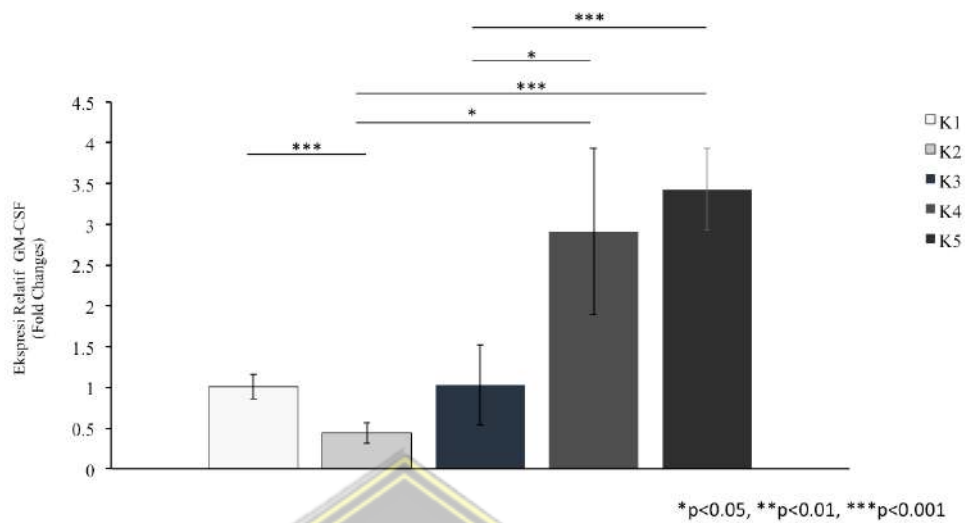
Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji post Tamhane, karena data tidak homogen. Data hasil uji post hoc Tamhane tersebut ditampilkan dalam Table 5.2 sebagai berikut.

Tabel 5.2. Perbedaan rerata ekspresi GM-CSF antar dua kelompok dengan

Uji Post Hoc Tamhane

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0,000
	K3	1,000
	K4	0,055
	K5	0,000
K2	K3	0,258
	K4	0,018
	K5	0,000
K3	K4	0,043
	K5	0,000
K4	K5	0,964

Berdasarkan data ekspresi GM-CSF yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik One Way ANOVA. Tabel 5.2. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa Kelompok K5 memiliki nilai GMCSF tertinggi, berbeda signifikan dibanding K1, K2, dan K3 ($p < 0,05$), sedangkan Kelompok K2 menunjukkan nilai GMCSF terendah, berbeda signifikan dengan K1, K4, dan K5.



Gambar 5.6. Grafik Ekspresi GM-CSF.

Terdapat pola penurunan pada K2 (terendah) dan K3. Kenaikan ekspresi GM-CSF paling kuat terjadi pada K4 dan K5.

5.1.4 Ekspresi IL-1 α

Data ekspresi IL-1 α yang diperoleh dari lima kelompok (K1 hingga K5) menunjukkan variasi yang signifikan dalam konsentrasinya. Kelompok K2 memiliki ekspresi IL-1 α tertinggi, yaitu $2,35 \pm 0,93$ pg/mL, diikuti oleh K3 dengan $2,00 \pm 0,51$ pg/mL, dan K4 dengan $1,28 \pm 0,48$ pg/mL. Kelompok K1 memiliki ekspresi yang lebih rendah, yaitu $1,03 \pm 0,31$ pg/mL, sedangkan ekspresi terendah ditemukan pada kelompok K5 dengan $0,95 \pm 0,33$ pg/mL.

Tabel 5.3. Data Hasil Analisis Ekspresi IL-1 α

Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	(pg/mL) Rerata $\pm$ SD	
IL-1α	1,03 $\pm$ 0,31	2,35 $\pm$ 0,93	2,00 $\pm$ 0,51	1,28 $\pm$ 0,48	0,95 $\pm$ 0,33	
Shapiro Wilk	0,18	0,14	0,26	0,84	0,90	
Lavene test						0,11
One Way Anova						0,001

Analisis distribusi data menggunakan uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa distribusi data pada setiap kelompok adalah normal ($p>0,05$). Selanjutnya, uji homogenitas varians menggunakan Levene test mengonfirmasi bahwa data ekspresi IL-1 α pada kelima kelompok memiliki varians yang homogen ($p>0,05$).

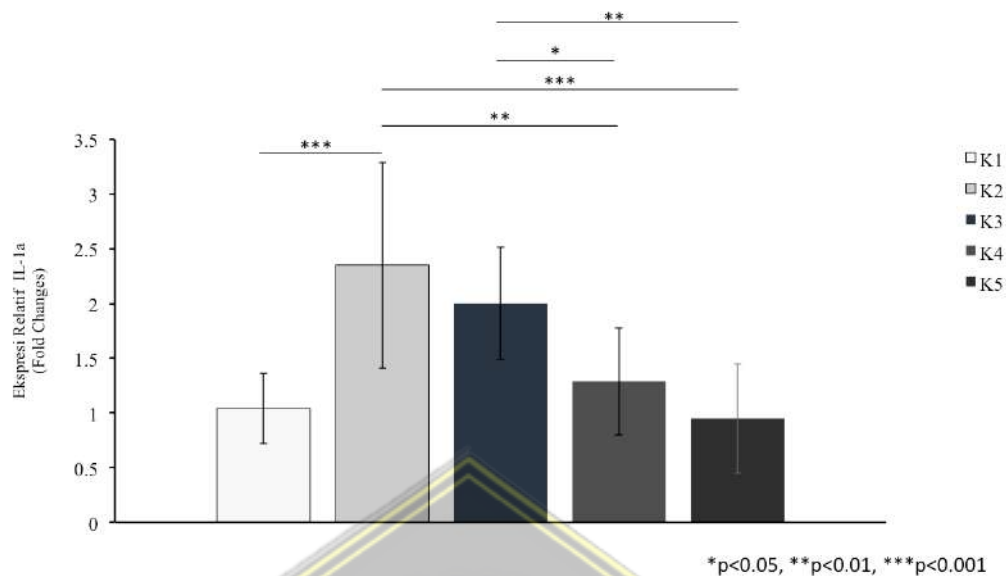
Analisis perbedaan ekspresi IL-1 α antar kelompok dilakukan menggunakan One-Way ANOVA, yang menghasilkan nilai signifikan secara statistik ($p<0,05$). Hasil ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok-kelompok tersebut. Dengan kata lain, perlakuan atau kondisi pada setiap kelompok memberikan pengaruh yang signifikan terhadap ekspresi IL-1 α .

Tabel 5.4. Perbedaan rerata ekspresi IL-1 α antar dua kelompok dengan

Uji Post Hoc LSD

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0,000
	K3	0,007
	K4	0,450
	K5	0,796
	K3	0,293
K2	K4	0,003
	K5	0,000
	K4	0,038
K3	K5	0,004
	K5	0,314

Berdasarkan data ekspresi IL-1 α yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik One Way ANOVA. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji post hoc LSD, karena data bersifat normal dan homogen. Data hasil uji post hoc LSD tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.4. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa perlakuan K2 dan K3 meningkatkan ekspresi IL-1 α secara signifikan ($p < 0,05$), dibandingkan K1, K4, dan K5.



Gambar 5.7. Grafik ekspresi IL-1α.

Terdapat pola penurunan ekspresi IL-1α yang signifikan pada K4 dan K5, diikuti oleh K3, yang menunjukkan kondisi inflamasi lebih tinggi. Penurunan ekspresi IL-1α terjadi pada K5, menandakan adanya efek perlakuan yang mampu menekan respon inflamasi. K4 juga relatif rendah, menunjukkan efek moderat dalam menurunkan IL-1α dibandingkan K2–K3.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Exosome hypoxia MSC merupakan microviscle diproduksi oleh MSC pada medium kultur dalam kondisi hipoksia. Studi terbaru menunjukkan bahwa EH-MSC memiliki potensi untuk mengurangi alopecia melalui berbagai mekanisme, termasuk melalui jalur protein dan microRNA (miRNA) tertentu.^{3,6,10} Eksosom MSC mengandung berbagai macam protein, seperti faktor pertumbuhan dan sitokin, yang dapat

merangsang pertumbuhan rambut dan memodulasi siklus pertumbuhan rambut.^{11,12} Selain itu, eksosom MSC juga mengandung miRNA yang dapat mempengaruhi ekspresi gen yang terlibat dalam regulasi siklus rambut. Pada alopecia androgenik, dihidrotestosteron (DHT) menstimulasi sekresi faktor penghambat pertumbuhan rambut, seperti transforming growth factor $\beta 1$ dan 2 (TGF- $\beta 1/p2$). Penyebab utama dari proses ini adalah stres oksidatif dan akumulasi spesies oksigen reaktif (ROS) secara bertahap di dalam sel, yang mengakibatkan hilangnya fungsinya. Dimana ROS memediasi respons terhadap DHT dan faktor pertumbuhan, yang pada gilirannya dapat memengaruhi pensinyalan faktor pertumbuhan di dalam sel.⁵⁴

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) adalah glikoprotein monomerik yang berfungsi sebagai sitokin, berperan penting dalam hematopoiesis dengan merangsang produksi dan diferensiasi berbagai sel darah putih, termasuk granulosit (neutrofil, eosinofil, dan basofil) serta monosit. GM-CSF adalah sitokin pleiotropik yang membangkitkan proses kompleks selama perbaikan luka.⁷⁶ IL- 1α , merupakan sitokin proinflamasi yang ada di mana-mana dan penting. Prekursor IL- 1α secara konstitutif terdapat di hampir semua jenis sel yang sehat, tetapi dilepaskan saat sel nekrotik mati sebagai mediator bioaktif. IL- 1α juga diekspresikan dengan menyusup ke sel myeloid di dalam jaringan yang cedera. Sitokin tersebut mengikat reseptor IL-1 1 (IL-1R1), seperti halnya IL- 1β , dan menginduksi efek proinflamasi yang sama.

Sebagai prekursor bioaktif yang dilepaskan saat kerusakan jaringan dan kematian sel nekrotik, IL-1 α merupakan pusat patogenesis berbagai kondisi yang ditandai dengan peradangan organ atau jaringan. Ini termasuk kondisi yang memengaruhi paru-paru dan saluran pernapasan, penyakit kulit dan kelainan kulit inflamasi, sklerosis sistemik, miokarditis, perikarditis, infark miokard, penyakit arteri koroner, trombosis inflamasi, serta kondisi multifaktorial yang kompleks seperti COVID-19, vaskulitis dan penyakit Kawasaki, sindrom Behcet, Sindrom Sjogren, dan kanker.²⁹

Pada penelitian ini, pemberian EH-MSC dengan dosis 100 μ g dan 200 μ g pada mencit model alopecia androgenik bertujuan untuk mengevaluasi efeknya terhadap ekspresi GM-CSF dan IL-1 α serta hubungan kedua parameter ini dengan gen regeneratif dan anti-inflamasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis 100 μ g dan 200 μ g EH-MSC dapat meningkatkan ekspresi GM-CSF secara signifikan hingga mencapai ekspresi yang setara dengan mencit sehat. Sementara itu, pemberian EH-MSC pada dosis 100 μ g dan 200 μ g menyebabkan penurunan ekspresi IL-1 α . Penurunan lebih kuat pada dosis 200 μ g dibandingkan 100 μ g.

Pada ekspresi GM-CSF, kelompok perlakuan dengan dosis 100 μ g dan 200 μ g menunjukkan peningkatan bermakna dibandingkan kontrol, terutama pada dosis 200 μ g. Peningkatan ini menggambarkan efek stimulasi EH-MSC dalam meningkatkan faktor regeneratif yang berperan pada proliferasi sel, angiogenesis, dan pemanjangan fase anagen folikel rambut. Hal ini sejalan dengan laporan Barrientos et al. (2008) yang

menjelaskan bahwa GM-CSF berperan penting dalam regenerasi jaringan melalui stimulasi fibroblas dan sel epitel. Dengan demikian, peningkatan GM-CSF akibat EH-MSC dapat memperbaiki lingkungan mikro folikel dan mendukung pertumbuhan rambut baru.⁸⁰⁻⁸¹

Sebaliknya, pada ekspresi IL-1 α , pemberian EH-MSC dosis 100 μ g maupun 200 μ g menurunkan kadar sitokin tersebut, dengan penurunan terbesar pada dosis 200 μ g. IL-1 α merupakan sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam kerusakan folikel rambut serta mempercepat miniaturisasi pada alopecia androgenik. Temuan ini sesuai dengan Philpott et al. (1996) yang melaporkan bahwa IL-1 α dapat menghambat pertumbuhan folikel rambut secara *in vitro*. Penurunan IL-1 α menunjukkan efek imunomodulator dan anti-inflamasi EH-MSC, sehingga menciptakan lingkungan yang lebih kondusif bagi regenerasi folikel.⁸²

Dengan demikian, kombinasi peningkatan GM-CSF dan penurunan IL-1 α pada perlakuan EH-MSC menegaskan potensi ganda terapi ini, yaitu sebagai agen regeneratif dan anti-inflamasi. Hal ini sejalan dengan penelitian Shin et al. (2015) yang melaporkan bahwa faktor parakrin dari stem cell mampu memperbaiki pertumbuhan rambut pada alopecia. Oleh karena itu, EH-MSC berpotensi dikembangkan sebagai terapi alternatif yang menjanjikan untuk alopecia androgenik.⁸³

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan. Pertama perlu penyetaraan hewan uji ya untuk mendapatkan model hewan coba yang tervalidasi lebih optimal satunya dengan *pre-*

eliminary study lebih lanjut. Kedua penelitian ini baru pada tahap hewan coba. Penelitian diharapkan dapat dilakukan ke tahap uji pada manusia agar segera diaplikasikan secara klinis. Ketiga diperlukan analisis lebih lanjut pada EH-MSC sebagai variabel bebas pada penelitian ini untuk menganalisis miRNA yang didapat, dengan tujuan untuk mengetahui fungsinya pada sel target.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi EH-MSC secara subcutan terhadap peningkatan ekspresi GM-CSF dan penurunan ekspresi IL-1 α pada mencit jantan C57BL6 model alopecia androgenik menunjukkan hal-hal berikut:

- a. Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) EH-MSC dosis 100 μ g dan 200 μ g terhadap peningkatan ekspresi GM-CSF pada mencit jantan C57BL6 model alopecia androgenik dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- b. Terdapat pengaruh pemberian (*Exosome hypoxia mesenchymal stem cell*) EH-MSC dosis 100 μ g dan 200 μ g terhadap penurunan ekspresi IL-1 α pada mencit jantan C57BL6 model alopecia androgenik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

- a. Perlu dilakukan uji klinis untuk mengetahui efektivitas dan keamanan *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSC) pada alopecia androgenik secara langsung pada manusia.
- b. Perlu dilakukan uji pre klinis sebelum dilakukan studi selanjutnya.
- c. Perlu menganalisis lebih lanjut untuk mengetahui jenis microRNA (miRNA) yang terdapat pada EH-MSC yang di uji.

DAFTAR PUSTAKA

1. Al Aboud AM, Syed HA, Zito PM. Alopecia. [Updated 2024 Feb 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538178/>
2. Kutlubay, Z., Baglam, S., Engin, B., & Serdaroglu, S. (2014). Erkeklerde androgenetik alopesi/Male androgenetic alopecia. *Turkderm, Suppl.Supplement 1*, 48, 36-39.
3. Ntshingila S, Oputu O, Arowolo AT, Khumalo NP. Androgenetic alopecia: An update. *JAAD Int.* 2023 Jul 22;13: 150-158.
4. Legiawati, L., Suseno, L. S., Sitohang, I. B. S., & Pratama, A. I. (2022). Hair disorder in dr. Cipto Mangunkusumo cosmetic dermatology and venereology outpatient clinic of Jakarta, Indonesia: A socio-demographic and clinical evaluation. *Dermatology reports, 14*(3), 9341. <https://doi.org/10.4081/dr.2022.9341>
5. Ho CH, Sood T, Zito PM. Alopecia Androgenetik. [Diperbarui 7 Januari 2024]. Dalam: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430924/>
6. Zhan Y, Lew AM, Chopin M. The Pleiotropic Effects of the GM-CSF Rheostat on Myeloid Cell Differentiation and Function: More Than a Numbers Game. *Front Immunol.* 2019 Nov 15;10:2679. doi: 10.3389/fimmu.2019.02679. PMID: 31803190; PMCID: PMC6873328.
7. Robert S. English, A hypothetical pathogenesis model for androgenic alopecia: clarifying the dihydrotestosterone paradox and rate-limiting recovery factors, *Medical Hypotheses*, Volume 111, 2018, Pages 73-81, ISSN 0306-9877, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.12.027>
8. Nestor MS, Ablon G, Gade A, Han H, Fischer DL. Treatment options for androgenetic alopecia: Efficacy, side effects, compliance, financial considerations, and ethics. *J Cosmet Dermatol.* 2021 Dec;20(12):3759-3781. doi: 10.1111/jocd.14537. Epub 2021 Nov 6. PMID: 34741573; PMCID: PMC9298335.

9. Ntshingila S, Oputu O, Arowolo AT, Khumalo NP. Androgenetic alopecia: An update. *JAAD Int.* 2023 Jul 22;13: 150-158.
10. Liang Y, Tang X, Zhang X, Cao C, Yu M, Wan M. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Carrying MiR-122-5p Antagonize the Inhibitory Effect of Dihydrotestosterone on Hair Follicles by Targeting the TGF- β 1/SMAD3 Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
11. Liu H, Kuang H, Wang Y, Bao L, Cao W, Yu L, et al. MSC-derived exosomes protect auditory hair cells from neomycin-induced damage via autophagy regulation. *Biol Res.* 2024;57(1).
12. Ha DH, Kim HK, Lee J, Kwon HH, Park GH, Yang SH, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells.* 2020.
13. Magnenat L, Suter T, Becher B. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology.* 2011; 12(6):560. <https://doi.org/10.1038/ni.2027>. PMID:21516112
14. Pekmezci E, Dunder C, Turkoglu M. Proprietary Herbal Extract Downregulates the Gene Expression of IL-1 α in HaCaT Cells: Possible Implications Against Nonscarring Alopecia. *Med Arch.* 2018 Apr;72(2):136-140. doi: 10.5455/medarh.2018.72.136-140. PMID: 30302033; PMCID: PMC6126931.
15. Pekmezci E, Turkoğlu M, Gökalp H, Kutlubay Z. Minoxidil Downregulates Interleukin-1 Alpha Gene Expression in HaCaT Cells. *Int J Trichology.* 2018 May-Jun;10(3):108-112. doi: 10.4103/ijt.ijt_18_17. PMID: 30034189; PMCID: PMC6029000.
16. Julien M.D. Legrand, Edwige Roy, Jonathan J. Ellis, Mathias Francois, Andrew J. Brooks, Kiarash Khosrotehrani, STAT5 Activation in the Dermal Papilla Is Important for Hair Follicle Growth Phase Induction, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 136, Issue 9, 2016, Pages 1781-1791, ISSN 0022-202X, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.04.014>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X16310648>)
17. Zhang C, Zhang X, Zhang M. Exosomes Derived from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSC) Protect Submandibular Glands in Diabetic Rats. *J Biomater Tissue Eng.* 2021;11(11):2168–73.

18. Chen YX, Deng ZH, Xue-Gao, Qiang-Du, Juan-Yin, Chen GH, et al. Exosomes derived from mesenchymal stromal cells exert a therapeutic effect on hypoxia-induced pulmonary hypertension by modulating the YAP1/SPP1 signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2023;168.
19. Al Aboud AM, Syed HA, Zito PM. Alopecia. 2024 Feb 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 30844205.
20. Cuevas-Diaz Duran, R.; Martinez-Ledesma, E.; Garcia-Garcia, M.; Bajo Gauzin, D.; Sarro-Ramírez, A.; Gonzalez-Carrillo, C.; Rodríguez-Sardin, D.; Fuentes, A.; Cardenas-Lopez, A. Biologi dan Genomik Folikel Rambut Manusia: Fokus pada Androgenetic Alopecia. *Int. J.Mol. Sains.* **2024** , 25 , 2542. <https://doi.org/10.3390/ijms25052542>
21. Asfour L, Cranwell W, Sinclair R. Alopecia Androgenetik Pria. [Diperbarui 25 Januari 2023]. Dalam: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, dkk., editor. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278957/>
22. Cuevas-Diaz Duran, R.; Martinez-Ledesma, E.; Garcia-Garcia, M.; Bajo Gauzin, D.; Sarro-Ramírez, A.; Gonzalez-Carrillo, C.; Rodríguez-Sardin, D.; Fuentes, A.; Cardenas-Lopez, A. Biologi dan Genomik Folikel Rambut Manusia: Fokus pada Androgenetic Alopecia. *Int. J.Mol. Sains.* **2024** , 25 , 2542. <https://doi.org/10.3390/ijms25052542>
23. Cortez, G. L., Hassun, K., Linhares, L. R. P., Florenço, V., Pinheiro, M. V. B., & Nascimento, M. M. D. (2025). Male androgenetic alopecia. *Anais brasileiros de dermatologia*, 100(2), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.08.004>
24. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Wikipedia, en.wikipedia.org/wiki/Granulocyte-macrophage_colony-stimulating_factor. 2023
25. Jie Ren , 1,2 Jingxuan Sun,1,2 Zhenghui Li,1,2 Yi Zhao , 1,2 and Hsiaohan Tuan. The Impact of Growth Factors in Platelet-Rich Plasma Combination Therapy for Androgenic Alopecia. *Wiley Dermatologic Therapy Volume* 2024, Article ID 8452387, 7 pages <https://doi.org/10.1155/2024/8452387>
26. Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, Zhang Y, Zhang L, Yuan ZR, Tan HS, Das G, Devadas S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.* 2006 Feb;16(2):126-33. doi: 10.1038/sj.cr.7310017. PMID: 16474424.

27. Jie Ren , 1,2 Jingxuan Sun,1,2 Zhenghui Li,1,2 Yi Zhao , 1,2 and Hsiaohan Tuan. The Impact of Growth Factors in Platelet-Rich Plasma Combination Therapy for Androgenic Alopecia. Wiley Dermatologic Therapy Volume 2024, Article ID 8452387, 7 pages <https://doi.org/10.1155/2024/8452387>
28. Lopez, C., & Petell, J. K. (2013). Method for hair growth using granulocyte-colony stimulating factor. US Patent Application Publication, US 2013/0164252 A1.
29. Giulio Cavalli, Serena Colafrancesco, Giacomo Emmi, Massimo Imazio, Giuseppe Lopalco, Maria Cristina Maggio, Jurgen Sota, Charles A. Dinarello, Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases, Autoimmunity Reviews, Volume 20, Issue 3, 2021, 102763, ISSN 1568-9972, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102763>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997221000227>)
30. Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T. *dkk*. Peran interleukin-1 dalam patologi umum. *Inflamm Regener* **39** , 12 (2019). <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>
31. Tahtinen, S., Tong, AJ., Himmels, P. *dkk*. IL-1 dan IL-1ra merupakan regulator utama respons inflamasi terhadap vaksin RNA. *Nat Immunol* **23** , 532–542 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01160-y>
32. An T, Chen Y, Tu Y, Lin P. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: Application and Challenges. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2021.
33. Novello S, Pellen-Mussi P, Jeanne S. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles as cell-free therapy: Perspectives in periodontal regeneration. *J Periodontal Res* [Internet]. 2021 Jun;56(3):433–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jre.12866>
34. Casado-Díaz A, Quesada-Gómez JM, Dorado G. Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8(March):1–19.
35. Kazi T, Nagata A, Nakagawa T, Matsuzaki T, Inui S. Dermal Papilla Cell-Derived Extracellular Vesicles Increase Hair Inductive Gene Expression in Adipose Stem Cells via β -Catenin Activation. *Cells*. 2022;11(2).

36. Zhang X, Bao P, Zheng Q, Chu M, Liang C, Guo X, et al. Comparative Analysis of mRNA and miRNA Expression between Dermal Papilla Cells and Hair Matrix Cells of Hair Follicles in Yak. *Cells*. 2022;11(24).
37. Winkler I, Engler JB, Vieira V, Bauer S, Liu YH, Di Liberto G, et al. MicroRNA-92a-CPEB3 axis protects neurons against inflammatory neurodegeneration. *Sci Adv*. 2023;9(47).
38. Liao Z, Zheng R, Shao G. Mechanisms and application strategies of miRNA-146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review). Vol. 51, *International Journal of Molecular Medicine*. 2023.
39. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol*. 2010;190(6):1079–91.
40. Choi JS, Yoon HI, Lee KS, Choi YC, Yang SH, Kim IS, et al. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release*. 2016;
41. Ruvolo PP, Jacamo R, Ruvolo VR, Burks JK, Battula VL, McQueen T, et al. Exosomes Mediate Communication Between the Microenvironment and Leukemic Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2012;120(21):3469–3469.
42. Qu Q, Pang Y, Zhang C, Liu L, Bi Y. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit vein graft intimal hyperplasia and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1).
43. Kang K, Ma R, Cai W, Huang W, Paul C, Liang J, et al. Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote Cardioprotection via Akt Signaling Pathway following Myocardial Infarction. *Stem Cells Int*. 2015;2015.
44. González-Cubero E, González-Fernández ML, Gutiérrez-Velasco L, Navarro-Ramírez E, Villar-Suárez V. Isolation and characterization of exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*. 2021;238(5):1203–17.
45. Jia-Li Yao, Yu-Rou Shi, Xue- Er Hu, Dai-Jun Yu, Bang-Yao Chen, Li-Jiang Wang, Xiao-Ling Xu, Meng-Lu Zhu, The role of exosomes in follicle regeneration of androgenic alopecia, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 90, 2023,105126, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105126>

46. Mysore V, Alexander S, Nepal S, Venkataram A. Regenerative Medicine Treatments for Androgenetic Alopecia. *Indian J Plast Surg.* 2021 Dec 13;54(4):514-520. doi: 10.1055/s-0041-1739257. PMID: 34984094; PMCID: PMC8719950.
47. Khatu SS, More YE, Gokhale NR, Chavhan DC, Bendsure N. Platelet-rich plasma in androgenic alopecia: myth or an effective tool. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014 Apr;7(2):107-10. doi: 10.4103/0974-2077.138352. PMID: 25136212; PMCID: PMC4134641.
48. Jia-Li Yao, Yu-Rou Shi, Xue- Er Hu, Dai-Jun Yu, Bang-Yao Chen, Li-Jiang Wang, Xiao-Ling Xu, Meng-Lu Zhu, The role of exosomes in follicle regeneration of androgenic alopecia, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 90, 2023, 105126, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105126>.
49. Pekmezci E, Turkoğlu M, Gökalep H, Kutlubay Z. Minoxidil Downregulates Interleukin-1 Alpha Gene Expression in HaCaT Cells. *Int J Trichology.* 2018 May-Jun;10(3):108-112. doi: 10.4103/ijt.ijt_18_17. PMID: 30034189; PMCID: PMC6029000.
50. Gokce N, Basgoz N, Kenanoglu S, Akalin H, Ozkul Y, Ergoren MC, Beccari T, Bertelli M, Dundar M. An overview of the genetic aspects of hair loss and its connection with nutrition. *J Prev Med Hyg.* 2022 Oct 17;63(2 Suppl 3):E228-E238. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2765. PMID: 36479473; PMCID: PMC9710406.
51. Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Faivre B, Chastel O, Sorci G. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proc Biol Sci.* 2007 Mar 22;274(1611):819-25. doi: 10.1098/rspb.2006.3764. PMID: 17251089; PMCID: PMC2093982.
52. Du F, Li J, Zhang S, Zeng X, Nie J, Li Z. Oxidative stress in hair follicle development and hair growth: Signalling pathways, intervening mechanisms and potential of natural antioxidants. *J Cell Mol Med.* 2024 Jun;28(12):e18486.
53. Cwynar A, Olszewska-Słonina DM, Czajkowski R. The impact of oxidative stress in androgenic alopecia in women. *Postepy Dermatol Alergol.* 2020 Feb;37(1):119-120. doi: 10.5114/ada.2019.81685. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32489344; PMCID: PMC7247070
54. Yarosz EL, Chang CH. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-mediated Immunity and Disease. *Immune Netw.* 2018 Feb 22;18(1):e14. doi: 10.4110/in.2018.18.e14. PMID: 29503744; PMCID: PMC5833121.

55. Morgan, M., Liu, Zg. Crosstalk spesies oksigen reaktif dan pensinyalan NF- κ B. *Cell Res* 21, 103–115 (2011). <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
56. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023.2017.
57. Jin J, Hu H, Li HS, Yu J, Xiao Y, Brittain GC, Zou Q, Cheng X, Mallette FA, Watowich SS, Sun SC. Noncanonical NF- κ B pathway controls the production of type I interferons in antiviral innate immunity. *Immunity*. 2014 Mar 20;40(3):342-54. doi: 10.1016/j.immuni.2014.02.006. PMID: 24656046; PMCID: PMC3983709.
58. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):344-62. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020. PMID: 18267068.
59. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):431-6. doi: 10.1038/nature04870. PMID: 16724054.
60. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*. 2012 Mar;246(1):379-400. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x. PMID: 22435567.
61. Carey A, Edwards DK 5th, Eide CA, Newell L, Traer E, Medeiros BC, Pollyea DA, Deininger MW, Collins RH, Tyner JW, Druker BJ, Bagby GC, McWeeney SK, Agarwal A. Identification of Interleukin-1 by Functional Screening as a Key Mediator of Cellular Expansion and Disease Progression in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep*. 2017 Mar 28;18(13):3204-3218. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.018. PMID: 28355571; PMCID: PMC5437102.
62. Faisal S, Toraih EA, Atef LM, Hassan R, Fouad MM, Al Ageeli E, Fawzy MS, Abdalla HA. MicroRNA-17-92a-1 Host Gene (MIR17HG) Expression Signature and rs4284505 Variant Association with Alopecia Areata: A Case-Control Study. *Genes (Basel)*. 2022 Mar 12;13(3):505.
63. El-Refaie, A.M. & Sorour, N.E. & Mustafa, Amany & El-Shimi, Ola & Mohammed, S. S. (2018). Study of Skin Expression of MicroRNA-146a in Patients with Alopecia Areata. *Benha Journal of Applied Sciences*. 3. 1-3. 10.21608/bjas.2018.191138
64. Hossain, MM, Khalid, A., Akhter, Z. dkk. Penemuan penghambat JAK3 yang baru dan sangat selektif sebagai pendorong pertumbuhan rambut yang ampuh. *J Transl Med* 22 , 370 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05144-4>

65. Paul S, Licona-Vázquez I, Serrano-Cano FI, Frías-Reid N, Pacheco-Dorantes C, Pathak S, Chakraborty S, Srivastava A. Current insight into the functions of microRNAs in common human hair loss disorders: a mini review. *Hum Cell*. 2021 Jul;34(4):1040-1050.
66. Mao Y, Liu P, Wei J, Xie Y, Zheng Q, Hu X, Yao J, Meng W. Exosomes derived from Umbilical cord mesenchymal stem cell promote hair regrowth in C57BL6 mice through upregulation of the RAS/ERK signaling pathway. *J Transl Int Med*. 2024 Nov 6;12(5):478-494. doi: 10.1515/jtim-2024-0012. PMID: 39513036; PMCID: PMC11538887.
67. Jun Qin^{1,2†}, Liang Shang^{1,3†}, An-song Ping², Jing Li¹, Xiao-jun Li¹, Hong Yu³, Jacques Magdalou⁴, Liao-bin Chen² * and Hui Wang¹ *
Correction: TNF/TNFR signal transduction pathway-mediated anti-apoptosis and antiinflammatory effects of sodium ferulate on IL-1 β induced rat osteoarthritis chondrocytes in vitro Qin et al. *Arthritis Research & Therapy* 2013, 15:407 <http://arthritis-research.com/content/15/3/407>
68. - JOUR, - Boland, Karen, - Flanagan, Lorna, - Prehn, Jochen, PY - 2013/07/01, SP - e725, T1 - Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3, VL - 4, DO - 10.1038/cddis.2013.250, JO - Cell death & disease, ER -
69. Widlak P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol*. 2000;47(4):1037-44. PMID: 11996094. <https://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/peran-mitokondria-dalam-apoptosis/>
70. JOUR, - Barbier, Louise, - Ferhat, Maroua, - Salamé, Ephrem, - Robin, Aurélie, - Herbelin, André, - Gombert, Jean-Marc, Silvain, Christine, Barbarin, Alice, PY - 2019/08/27, SP - 2014, T1 - Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases, VL - 10, DO - 10.3389/fimmu.2019.02014, JO - Frontiers in Immunology, ER -, https://www.researchgate.net/figure/IL-1-cytokine-family-intracellular-and-extracellular-processing-A-Intracellular_fig1_335424040
71. Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces antiapoptotic and proapoptotic signals in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):630-7. doi: 10.1182/blood-2002-06-1890. Epub 2003 Mar 27. PMID: 12663443.
72. Park, Kyungho Y. Method for Hair Growth Using Granulocyte-Colony Stimulating Factor. US Patent US20130164252A1, 2013. United States Patent and Trademark Office.

73. Gentile, P., & Garcovich, S. (2020). Autologous activated platelet-rich plasma (AA-PRP) and non-activated (A-PRP) in hair growth: a retrospective, blinded, randomized evaluation in androgenetic alopecia. *Expert opinion on biological therapy*, 20(3), 327–337. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1724951>
74. Ersan, M., Ozer, E., Akin, O., Tasli, P. N., & Sahin, F. (2024). Effectiveness of Exosome Treatment in Androgenetic Alopecia: Outcomes of a Prospective Study. *Aesthetic plastic surgery*, 48(21), 4262–4271. <https://doi.org/10.1007/s00266-024-04332-3>
75. Chen BD, Clark CR, Chou TH. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates monocyte and tissue macrophage proliferation and enhances their responsiveness to macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1988 Apr;71(4):997-1002. PMID: 2833334.
76. Legrand, J. M. D., Roy, E., Ellis, J. J., Francois, M., Brooks, A. J., & Khosrotehrani, K. (2016). STAT5 Activation in the Dermal Papilla Is Important for Hair Follicle Growth Phase Induction. *The Journal of investigative dermatology*, 136(9), 1781–1791. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.04.014>
77. Wang, E., Harel, S., & Christiano, A. M. (2016). JAK-STAT Signaling Jump Starts the Hair Cycle. *The Journal of investigative dermatology*, 136(11), 2131–2132. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.08.029>
78. Liang A, Fang Y, Ye L, Meng J, Wang X, Chen J, Xu X. Signaling pathways in hair aging. *Front Cell Dev Biol*. 2023 Nov 16;11:1278278. doi: 10.3389/fcell.2023.1278278. PMID: 38033857; PMCID: PMC10687558.
79. Etienne Wang, Sivan Harel, Angela M. Christiano, JAK-STAT Signaling Jump Starts the Hair Cycle, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 136, Issue 11, 2016, Pages 2131-2132, ISSN 0022-202X, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.08.029>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X16323740>)
80. Garza LA, Yang CC, Zhao T, Blatt HB, Lee M, He H, Stanton DC, Carrasco L, Spiegel JH, Tobias JW, Cotsarelis G. Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. *J Clin Invest*. 2011 Feb;121(2):613-22. doi: 10.1172/JCI44478. Epub 2011 Jan 4. PMID: 21206086; PMCID: PMC3026732.

81. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2008), PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16: 585-601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>
82. Philpott MP, Sanders DA, Bowen J, Kealey T. Effects of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor on human hair follicle growth in vitro: a possible role for interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in alopecia areata. *Br J Dermatol*. 1996 Dec;135(6):942-8. doi: 10.1046/j.1365-2133.1996.d01-1099.x. PMID: 8977716.
83. Lee JK, Park SR, Jung BK, Jeon YK, Lee YS, et al. (2013) Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. *PLOS ONE* 8(12): e84256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084256>
84. Liang A, Fang Y, Ye L, Meng J, et al. (2023) Signaling Pathways in Hair Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1278278>

