

Pengaruh Gel Topikal SH-MSCs Terhadap Ekspresi Gen TNF- α Pada Tikus Wistar Model Alopecia Yang Diinduksi *Fluconazole*

Angga Pria Sundawa^{1*}, Annisa Nurul Hikmah², Ariesta Kurniasari Budi Fristiani³,
Tulus Ariyadi⁴, Reza Adityas Trisnadi⁵

^{1,5}Program Studi S1 Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung Semarang

^{2,3,4}Program Studi D3 Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan,
Universitas Muhammadiyah Semarang

Email: angga@unissula.ac.id^{1*}

Abstrak

Alopecia ditandai dengan gangguan siklus rambut, sementara terapi konvensional seperti minoksidil sering menimbulkan efek samping iritasi. Penelitian ini bertujuan menganalisis efek gel topikal sekretom mesenchymal stem cells terkondisi hipoksia (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen TNF- α pada model alopecia. Sebanyak 24 ekor tikus Wistar jantan dibagi menjadi empat kelompok: kelompok sehat, kontrol negatif (alopesia + base gel), serta dua kelompok perlakuan yang diberi gel SH-MSCs dosis 100 μ L/kgBB dan 200 μ L/kgBB. Ekspresi gen TNF- α diukur dengan RT-PCR pada hari ke-22. Hasil menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α yang signifikan ($p < 0,001$) pada kelompok perlakuan, dengan efek tertinggi pada dosis 200 μ L/kgBB ($0,63 \pm 0,20$) dibandingkan kontrol ($2,54 \pm 2,00$). Analisis statistik dengan uji One-Way ANOVA dan post-hoc LSD mengonfirmasi perbedaan bermakna antar semua kelompok ($p < 0,05$). Kesimpulannya, gel topikal SH-MSCs dosis 200 μ L/kgBB efektif menekan ekspresi TNF- α dan berpotensi sebagai terapi alternatif alopecia yang aman. Penelitian ini memberikan dasar preklinis untuk pengembangan terapi topikal berbasis sekretom.

Keywords: Alopecia like, Gel topikal SH-MHSCs, IL-10, TNF- α

PENDAHULUAN

Alopecia merupakan kelainan dermatologis yang ditandai dengan gangguan siklus rambut, di mana fase anagen menjadi lebih pendek dan fase telogen lebih panjang, sehingga menyebabkan kerontokan rambut berlebihan (Li et al., 2022). Kondisi ini dapat menimbulkan dampak psikologis maupun kualitas hidup yang signifikan bagi penderita. Kejadian alopecia areata dilaporkan mengenai 0,1–0,2% populasi, dengan risiko seumur hidup mencapai 1,7% pada pria dan wanita (Safavi et al., 1995).

Terapi standar yang banyak digunakan saat ini, seperti minoksidil topikal atau transplantasi rambut, memiliki

keterbatasan. Minoksidil dapat menimbulkan efek samping berupa iritasi, dermatitis kontak, hingga reaksi alergi pada kulit kepala (Rossi et al., 2012). Sementara transplantasi rambut tidak selalu efektif karena jumlah folikel rambut sehat terbatas, terutama pada pasien dengan kerontokan parah (Pratt et al., 2017). Keterbatasan ini mendorong perlunya alternatif terapi yang lebih aman dan efektif.

Salah satu kandidat terapi baru adalah *secretome mesenchymal stem cells* (MSC), khususnya *secretome hypoxia MSCs* (SH-MSCs). *Secretome* ini mengandung faktor bioaktif yang bersifat imunomodulator, pro-angiogenik, serta mampu mempercepat regenerasi jaringan kulit (Madrigal et al.,

2014; Kehl et al., 2019). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa aplikasi topikal *secretome* MSC dapat memperbaiki kondisi peradangan kulit dan mendukung pertumbuhan rambut melalui regulasi sitokin pro-inflamasi, termasuk TNF- α (Deng et al., 2021) (Zhou et al., 2021).

Meskipun potensinya menjanjikan, penelitian mengenai efek SH-MSCs topikal terhadap alopecia masih terbatas, khususnya pada model alopecia yang diinduksi oleh fluconazole. Padahal, model ini penting untuk merepresentasikan kerontokan rambut akibat gangguan fase anagen/telogen (Thompson III et al., 2019). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen TNF- α pada tikus Wistar model alopecia yang diinduksi *fluconazole*.

METODE

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vivo* dengan rancangan *Post-Test Only Control Group Design*. Sebanyak 24 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berusia 2-3 bulan dengan bobot badan sekitar 200 g digunakan dalam penelitian ini. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari sebelum percobaan dimulai dan dipelihara dalam kondisi standar. Hewan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan.

Hewan dibagi secara acak menjadi empat kelompok perlakuan ($n = 6$ per kelompok): K1 (Kontrol Positif): Tikus sehat tanpa induksi alopecia dan tanpa

perlakuan gel. K2 (Kontrol Negatif): Tikus dengan model alopecia yang diolesi *base gel* (tanpa *secretom*) setiap hari. K3 (Perlakuan 1): Tikus dengan model alopecia yang diolesi *gel* topikal *secretom* SH-MSCs dosis 100 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ setiap hari. K4 (Perlakuan 2): Tikus dengan model alopecia yang diolesi *gel* topikal *secretom* SH-MSCs dosis 200 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ setiap hari.

Model alopecia diinduksi dengan pemberian *flukonazol* dosis 35 mg/kgBB selama 14 hari. *Gel* topikal SH-MSCs dioleskan sekali sehari sesuai kelompok dosis selama 6 hari. Setelah perlakuan, sampel kulit kepala tikus diambil untuk pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan *hematoksilin-eosin* (HE) dan analisis ekspresi gen TNF- α menggunakan metode RT-qPCR (primer spesifik untuk TNF- α dan IL-10).

Data dievaluasi normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas dengan uji *Levene*. Perbedaan antar kelompok dianalisis menggunakan ANOVA satu arah, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD. Pengolahan data dilakukan menggunakan SPSS versi 26.0 dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

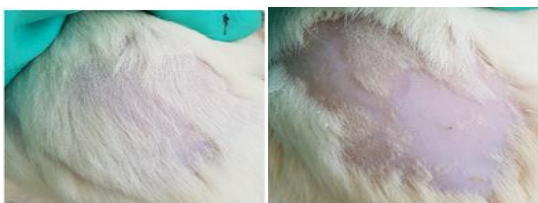
HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi Makroskopis dan Pewarnanan Histopatologi HE

1. Gambaran makroskopis kulit tikus *alopecia*

Pengamatan makroskopis pada hari ke-14 menunjukkan perlambatan pertumbuhan bulu yang signifikan pada kelompok tikus yang diinduksi *fluconazole*

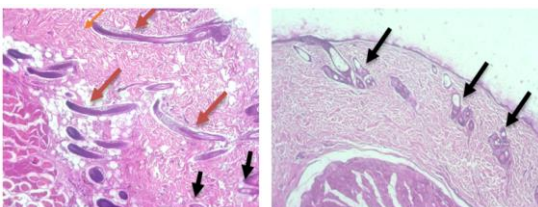
dibandingkan dengan kelompok sehat (Gambar 1). Rata-rata persentase kebotakan pada kelompok sehat adalah $51,11 \pm 10,27\%$, sedangkan pada kelompok model alopecia mencapai $68,26 \pm 7,96\%$. Hasil ini memvalidasi bahwa pemberian *fluconazole* 35 mg/kgBB berhasil menginduksi gangguan pertumbuhan bulu pada model tikus:



Gambar 1. Perbandingan pertumbuhan bulu tikus sehat dengan tikus yang diberikan *fluconazole*

2. Hasil pewarnaan HE jaringan kulit tikus alopecia

Analisis histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) mengonfirmasi temuan ini. Preparat jaringan kulit kelompok model alopecia menunjukkan ketidakhadiran folikel rambut dalam fase anagen, yang justru banyak ditemukan pada kelompok sehat. Sebaliknya, folikel pada kelompok model banyak yang berada dalam fase telogen (Gambar 2), mengindikasikan terganggunya siklus pertumbuhan rambut:



Gambar 2. Validasi folikel rambut tikus sehat dan alopecia menggunakan HE. Panah hitam menunjukkan folikel fase telogen, panah merah menunjukkan folikel fase anagen

Ekspresi gen TNF- α

Pemberian gel topikal SH-MSCs menunjukkan efek yang signifikan dalam menurunkan ekspresi gen TNF- α pada model tikus alopecia. Hasil analisis RT-qPCR (Tabel 1) menunjukkan bahwa ekspresi TNF- α tertinggi terdapat pada kelompok kontrol negatif (K2; 2.54 ± 2.00). Kelompok yang diberi SH-MSCs dosis 100 $\mu\text{L/kgBB}$ (K3) menunjukkan penurunan menjadi 1.40 ± 0.10 , dan penurunan terbesar terjadi pada kelompok dosis 200 $\mu\text{L/kgBB}$ (K4; 0.63 ± 0.20):

Tabel 1. Ekspresi gen TNF- α .

Variabel	Kelompok			p-value
	P2/K2 n = 6	P3/K3 n = 6	P4/K4 n = 6	
Ekspresi gen TNF- α	$2,54 \pm 2,00$	$1,40 \pm 0,10$	$0,63 \pm 0,20$	
<i>Saphiro wilk</i>	0,26	0,47	0,38	0,77
<i>Levene's Test</i>				0,00
<i>One way Anova</i>				0,00

Keterangan: Uji *Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal), *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen), *One way Anova* ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

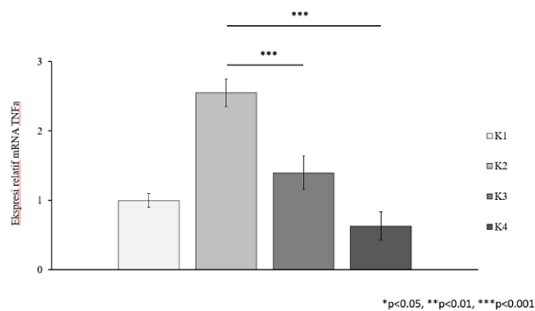
Analisa statistik untuk normalitas dan homogenitas ekspresi gen TNF- α didapatkan hasil data berdistribusi normal dengan uji *Shapiro Wilk* ($p > 0,05$), dengan himogenitas data didapatkan dari nilai uji *Levene's Test* yaitu 0.77 ($p > 0,05$).

Tabel 2. Perbandingan ekspresi gen TNF- α antar kelompok dengan uji *Post Hoc LSD*

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Nilai Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
P2	P3*	0,00	0,88	1,41
	P4*	0,00	1,65	2,17
P3	P2*	0,00	-1,41	-0,88
	P4*	0,00	0,50	1,03
P4	P2*	0,00	-2,18	-1,65
	P3*	0,00	-1,03	-0,50

Uji LSD*:
 *mean difference significant $p < 0,05$

Uji statistik *One-Way* ANOVA dengan nilai 0.00 menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan antar kelompok ($p < 0.05$). Uji *Post-Hoc* *LSD* mengungkapkan bahwa semua perbandingan berpasangan antar kelompok, menunjukkan bahwa setiap peningkatan dosis memberikan efek penurunan TNF- α yang bermakna.



Gambar 3. Grafik Ekspresi Gen TNF- α Tiap Kelompok

Grafik Ekspresi Gen TNF- α . Terlihat penurunan ekspresi yang bergantung pada dosis. Nilai tertinggi pada kelompok kontrol (K2) dan terendah pada kelompok perlakuan dosis tertinggi (K4).

Penelitian ini berhasil mendemonstrasikan bahwa aplikasi topikal sekretom dari *mesenchymal stem cell* yang dikondisikan hipoksia (SH-MSCs) efektif menurunkan ekspresi gen TNF- α pada model tikus alopecia yang diinduksi *fluconazole*, dan efek ini bersifat tergantung-dosis.

Temuan ini sejalan dengan peran kunci TNF- α sebagai sitokin pro-inflamasi utama dalam patogenesis alopecia, khususnya Alopecia Areata (AA) (Ito & Tokura, 2014; Philpott et al., 1996). TNF- α diketahui mengganggu siklus folikel rambut dengan memendekkan fase anagen

(pertumbuhan) dan memperpanjang fase telogen (istirahat), yang secara klinis termanifestasi sebagai kerontokan rambut. Hasil pewarnaan HE yang menunjukkan dominasi fase telogen pada kelompok model semakin mengukuhkan hal ini.

Mekanisme aksi SH-MSCs diduga kuat melalui efek parakrinnya yang kaya akan faktor pertumbuhan dan sitokin anti-inflamasi. Sekretom MSC memiliki kemampuan imunomodulator yang poten untuk memodulasi lingkungan inflamasi (Darlan et al., 2021). Dalam konteks ini, sekretom yang diaktivasi oleh TNF- α justru dapat menekan respons peradangan lebih lanjut dengan menginduksi produksi IL-10, sebuah sitokin anti-inflamasi, dalam sel makrofag (Németh et al., 2009). Penurunan kadar TNF- α yang signifikan, seperti yang ditemukan pada penelitian ini, secara efektif dapat memutus lingkaran setan inflamasi yang menyerang folikel rambut, sehingga menciptakan lingkungan yang lebih kondusif untuk masuknya folikel ke dalam fase anagen kembali.

Temuan dari (Deng et al., 2021) mendukung hasil kami, di mana MSC dari folikel rambut (HF-MSCs) terbukti mempromosikan proliferasi folikel dan mengurangi infiltrasi sel T CD8+ serta produksi IFN- γ , yang merupakan mediator kunci dalam serangan autoimun pada AA. Penurunan TNF- α oleh SH-MSCs dalam penelitian kami mungkin merupakan bagian dari mekanisme imunomodulasi yang lebih luas ini, yang tidak hanya menekan satu sitokin tetapi juga mengembalikan

keseimbangan imunologis secara keseluruhan di sekitar folikel rambut.

KESIMPULAN

Kesimpulannya, gel topikal SH-MSCs, terutama pada dosis 200 µL/kgBB, menunjukkan potensi terapi yang menjanjikan untuk alopecia dengan mekanisme utama melalui penekanan ekspresi TNF-α. Penelitian lebih lanjut disarankan untuk: (1) Mengeksplorasi parameter imunologi lain seperti IL-10, IL-1β, dan IL-6 untuk pemetaan inflamasi yang lebih komprehensif; (2) Memvalidasi temuan pada model hewan yang lebih kompleks; serta (3) Melakukan uji toksisitas dan uji klinis fase awal pada manusia untuk menilai keamanan dan dosis optimal formulasi gel ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Muhammadiyah Semarang dan Universitas Islam Sultan Agung Semarang atas dukungan fasilitas laboratorium dan sarana penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian serta penyusunan manuskrip ini.

DAFTAR PUSTAKA

Darlan, D. M., Munir, D., Putra, A., & Jusuf, N. K. (2021). MSCs-released TGFβ1 generate CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ in T-reg cells of human SLE PBMC. *Journal of the Formosan Medical Association*, 120(1), 602–608.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.06.028)

[j.fma.2020.06.028](https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13287-021-02614-0)

- Deng, W., Zhang, Y., Wang, W., Song, A., Mukama, O., Huang, J., Han, X., Deng, S., Lin, Z., & Habimana, J. du D. (2021). Hair follicle-derived mesenchymal stem cells decrease alopecia areata mouse hair loss and reduce inflammation around the hair follicle. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 548.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13287-021-02614-0>
- Ito, T., & Tokura, Y. (2014). The role of cytokines and chemokines in the T-cell-mediated autoimmune process in alopecia areata. *Experimental Dermatology*, 23(11), 787–791.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/exd.12489>
- Kehl, D., Generali, M., Mallone, A., Heller, M., Uldry, A.-C., Cheng, P., Gantenbein, B., Hoerstrup, S. P., & Weber, B. (2019). Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *NPJ Regenerative Medicine*, 4(1), 8.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41536-019-0070-y>
- Li, Y., Wang, G., Wang, Q., Zhang, Y., Cui, L., & Huang, X. (2022). Exosomes secreted from adipose-derived stem cells are a potential treatment agent for immune-mediated alopecia. *Journal of Immunology Research*, 2022(1), 7471246.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2022/7471246>
- Madrigal, M., Rao, K. S., & Riordan, N. H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 260.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>
- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi,

- K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., & Brown, J. M. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine*, 15(1), 42–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nm.1905>
- Philpott, M. P., Sanders, D. A., Bowen, J., & Kealey, T. (1996). 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- α in alopecia areata. *British Journal of Dermatology*, 135(6), 942–948. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.d01-1099.x>
- Pratt, C. H., King, L. E., Messenger, A. G., Christiano, A. M., & Sundberg, J. P. (2017). Alopecia areata. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.11>
- Rossi, A., Cantisani, C., Melis, L., Iorio, A., Scali, E., & Calvieri, S. (2012). Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 6(2), 130–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/187221312800166859>
- Safavi, K. H., Muller, S. A., Suman, V. J., Moshell, A. N., & Melton III, L. J. (1995). Incidence of alopecia areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 through 1989. *Mayo Clinic Proceedings*, 70(7), 628–633. <https://doi.org/https://doi.org/10.4065/70.7.628>
- Thompson III, G. R., Krois, C. R., Affolter, V. K., Everett, A. D., Varjonen, E. K., Sharon, V. R., Singapuri, A., Dennis, M., McHardy, I., & Yoo, H. S. (2019). Examination of fluconazole-induced alopecia in an animal model and human cohort. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2), 10–1128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aac.01384-18>
- Zhou, C., Li, X., Wang, C., & Zhang, J. (2021). Alopecia areata: an update on etiopathogenesis, diagnosis, and management. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 61(3), 403–423. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12016-021-08883-0>