

Gambaran Makroskopis Dan Pewarnaan Histologi HE Pada Tikus Wistar Model Alopecia Like Yang Diinduksi Fluconazole

Annisa Nurul Hikmah¹, Ariesta Kurniasari Budi Fristiani², Tulus Ariyadi³, Angga Pria Sundawa⁴, Reza Adityas Trisnadi⁵

Universitas Muhammadiyah Semarang

anhikmah@unimus.ac.id¹, aristakurniasari@unimus.ac.id², toelus@unimus.ac.id³,
angga@unissula.ac.id⁴, rezaadityas@unissula.ac.id⁵

Abstract: Fluconazole-induced alopecia is an increasingly common side effect reported in long-term therapy, both in humans and experimental animals. The aim of this study was to determine the macroscopic appearance and histological staining results of hematoxylin-eosin (HE) in fluconazole-induced Wistar rats. The method used was an in vivo experimental study with a Post Test Only Control Group Design. Male Wistar rats were divided into a fluconazole-induced treatment group and a healthy control group. Skin tissue analysis was performed on the 14th day to observe the macroscopic appearance and HE staining results. The results showed that macroscopically, the treatment group showed a slowdown in hair growth compared to the healthy control group. HE staining showed that administration of 35 mg/kgBW of fluconazole for 14 days caused a reduction in hair follicles in the anagen phase. In conclusion, fluconazole administration caused a slowdown in hair growth and disruption of anagen phase follicles in Wistar rats.

Keywords: Alopecia-like, Fluconazole, Hematoxylin-eosin, Macroscopic

Article info: Submitted | Revised | Accepted

Copyright © 2025, Hikmah, et al.



This is an open-access article under the CC BY-NC-SA 4.0

How to Cite :

Introduction

Alopecia-like akibat penggunaan fluconazole merupakan efek samping yang semakin sering dilaporkan pada terapi jangka panjang, baik pada manusia maupun hewan coba. Studi pada tikus Wistar yang diberi fluconazole dosis terapeutik menunjukkan peningkatan jumlah folikel rambut dalam fase telogen, mengindikasikan telogen effluvium sebagai bentuk kerontokan rambut yang dipicu obat. Fenomena ini dapat diamati secara makroskopis berupa penipisan bulu dan kebotakan difus tanpa adanya perubahan retinoid endogen sebagai mekanisme dasar.

Secara makroskopis, tikus Wistar model alopecia-like menunjukkan penipisan bulu, distribusi rambut yang tidak merata, dan area telanjang yang menyerupai telogen effluvium. Studi sebelumnya juga mencatat penurunan densitas folikel sehat beberapa minggu setelah induksi fluconazole. Pewarnaan hematoksin-eosin (HE) menjadi metode standar untuk menilai perubahan struktur folikel rambut, termasuk dominasi fase telogen dibandingkan fase anagen.

Methodology

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo dengan menggunakan rancangan penelitian Post Test Only Control Group Design. Subyek penelitian

menggunakan 24 ekor tikus jantan galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200 g dan sesuai kriteria inklusi dan eklusi, diaklamatisasi selama 7 hari. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok, kelompok tikus sehat tanpa perlakuan (P1/K1), kelompok kontrol negatif yaitu tikus dengan Alopesia yang diolesi base gel/hari kemudian pada hari ke 6 jaringan kulit diambil untuk diperiksa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan metode RT-qPCR (P2/K2), kelompok tikus dengan Alopesia yang diberikan Gel topikal MSC dosis 100 μ L/kgBB dalam 100 mg gel setiap hari sebanyak 1x pada pagi hari, hari ke 6 jaringan kulit diambil untuk diperiksa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan metode RT-qPCR (P3/K3), dan kelompok tikus dengan Alopesia yang diberikan Gel topikal MSC dosis 200 μ L/kgBB dalam 100mg gel setiap hari sebanyak 1x pada pagi hari, hari ke 6 jaringan kulit diambil untuk diperiksa ekspresi gen IL-10 dan TNF- α dengan metode RT-qPCR (P4/K4).

Bahan penelitian

Bahan penelitian menggunakan bahan kultur yaitu tali pusat tikus, dinitrophenyl-bovine serum albumin (DNP-BSA), gel aluminium hidroksida (Al(OH)), 2,4-Dinitrochlorobenzene 1,5% (DNCB), aseton-minyak zaitun NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alkohol 70%, PBS, Ketamin, dan Xylazine, dan bahan lainnya seperti Aquades, NaCl 0,9%, Fungizon 0.5%, Streptomisin-penicilin 1% (penstrep), dan Povidon iodine.

Peralatan penelitian

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri Biosafety Cabinet (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, dissecting kit, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan hypoxic chamber. Oxygen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam hypoxic chamber. Selain itu, penelitian ini juga steril swab untuk mengoleskan gel topikal SH-MSCs. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi gen IL-10 dan TNF- α seperti Sentrifuge, Beaker glass, Cell counter, Disposable pipet, Spuit 1 cc, Mikroskop cahaya, Alat cukur, Set alat bedah, Mikropipet, Masker, Handscoon, Kandang hewan coba, Micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip), Pipette filler, Conical tube (15 ml, 50 ml), Biosafety, Inverted microscope, Cryotube 1 ml, Scissor, dan Pinset.

Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

(1) Sampel kulit pada semua kelompok diambil untuk dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). (2) Sampel kulit tikus pada semua kelompok diambil dan difiksasi dalam larutan NBF 10%. (3) Sampel kulit dibilas dengan alkohol 70% sampai bersih dari sisa larutan fiksatif. (4) Sampel kulit dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 30 menit untuk proses dehidrasi. (5) Sampel kulit dimasukkan ke dalam toluol sampai jernih atau transparan selama 1 jam. (6) Infiltrasi ke dalam parafin dilakukan di dalam oven pada suhu 56-60°C dengan cara memasukkan sampel kulit ke dalam campuran toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Sampel kulit dimasukkan ke dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III masing-masing perlakuan selama 30 menit. (7) Embedding, sampel kulit dari parafin murni ditanamkan ke dalam cetakan blok parafin yang telah berisi parafin cair dan ditunggu hingga parafin mengeras. (8) Sampel kulit dalam blok paraffin diiris dengan ketebalan irisan sebesar 6 μ m menggunakan mikrotom. (9) Irisan sampel jaringan ditempelkan pada gelas benda dengan cara mengoleskan Mayer's albumin dan ditetesi sedikit akuades lalu dipanaskan di atas hot plate hingga irisan menempel dengan sempurna. (10) Sediaan histologis dideparafinasi dengan cara dimasukkan ke dalam xylol selama 24 jam. (11) Staining (pewarnaan) dilakukan dengan pewarna hematoksilin-

eosin. Kandungan xylol diserap dengan kertas saring, kemudian berturut-turut dimasukkan ke alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, dan akuades masing-masing dilakukan selama 1-2 menit. Preparat dimasukkan ke dalam pewarna Hematoksin selama 5-10 detik, lalu dibilas dengan air mengalir selama 10 menit. Proses selanjutnya preparat dicelupkan ke dalam alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70% masing-masing selama 3-5 menit. Preparat dimasukkan ke dalam eosin selama 5-10 menit, kemudian dicelupkan ke alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96% masing-masing selama 3-5 menit, lalu dikeringkan dengan kertas saring. Preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 15 menit, kemudian sediaan histologis ditetesi canada balsam. (12) Preparat ditutup kaca penutup, diberi label, dan disimpan dalam kotak sediaan.

Result

1. Validasi Makroskopis dan Pewarnaan Histopatologi HE

Gambar 5.4 Perbandingan pertumbuhan bulu tikus sehat dengan tikus yang diberikan fluconazole



Sehat H14



Fluconazole H14

Hasil pengamatan secara makroskopis pada kulit tikus alopecia like pada hari ke 14 setelah pemberian fluconazole menunjukkan perlambatan pertumbuhan bulu pada tikus jika dibandingkan dengan kelompok tikus sehat, seperti pada gambar 5.4:

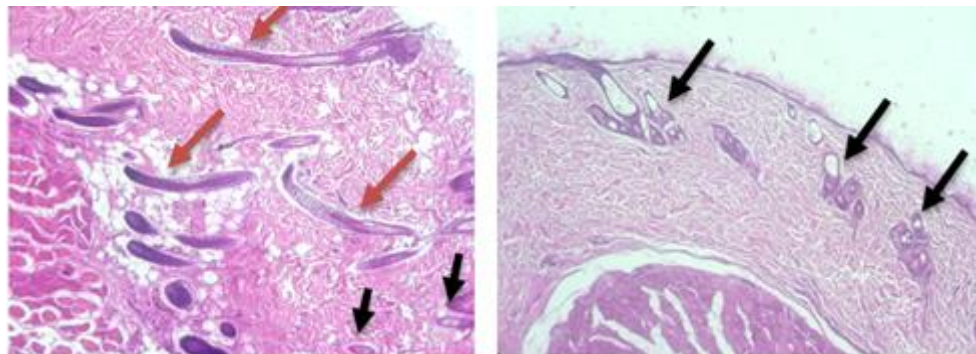
Rata-rata persentase kebotakan hari ke 14 pada kelompok sehat didapatkan hasil $51,11 \pm 10,27$ sedangkan pada kelompok alopecia like didapatkan hasil rata-rata $68,26 \pm 7,96$, pengamatan secara makroskopis hasil prakondisi hewan coba tikus tervalidasi mengalami gangguan pertumbuhan bulu dengan pemberian Flukonazole 35 mg/kgBB,

2. Hasil pewarnaan HE jaringan kulit tikus alopecia like

Hasil pembacaan preparat histopatologi dengan pewarnaan hematoxylin-eosin (HE) menunjukkan bahwa kelompok tikus yang diinduksi dengan Flukonazole 35 mg selama 14 hari menyebabkan gangguan pada anagen follicle sehingga terjadi kerontokan, Preparat HE menunjukkan hasil tidak ditemukannya fase anagen follicle pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok tikus sehat yang berbeda secara mikroskopis

memiliki fase anagen follicle pada lapangan pandang. Hasil analisis pewarnaan HE ditunjukkan pada gambar 5.5.

Gambar 5.5 Validasi folikel rambut tikus sehat dan *alopecia like* menggunakan HE. Panah hitam menunjukkan folikel fase telogen, panah merah menunjukkan folikel fase anagen



Discussion

Alopesia merupakan kelainan dermatologis yang disebabkan infeksi bakteri atau jamur, inflamasi, maupun disregulasi imun.¹ Gangguan ditandai dengan fase anagen yang lebih pendek dan fase telogen yang lebih panjang dalam siklus rambut.¹ Keutuhan ujung rambut berhubungan dengan rambut kortikal, tekstur dan kilap rambut berhubungan dengan kualitas permukaannya.²³ Normalnya rambut akan terlepas dari kulit kepala hingga kurang lebih 100 helai setiap harinya, dianggap tidak normal bila lebih banyak rambut rontok dari 120 helai setiap hari, kerontokan rambut difus dan lokal keduanya mungkin terjadi rambut unifokal atau multifokal.²⁴

Pemberian fluconazole secara oral selama 14 hari berhasil menginduksi kondisi alopesia-like pada tikus Wistar, yang ditandai dengan kerontokan rambut secara makroskopis, terutama di area punggung. Hal ini sesuai dengan laporan sebelumnya yang menunjukkan bahwa fluconazole, sebagai agen antijamur golongan azol, dapat mengganggu metabolisme kolesterol dan sterol lain yang penting bagi pertumbuhan folikel rambut. Secara klinis, tampak penipisan rambut dan area kebotakan yang menyerupai pola telogen effluvium. Fenomena ini menunjukkan bahwa tikus Wistar dapat menjadi model hewan yang representatif untuk mempelajari alopesia akibat obat.

Secara histologis, kelompok tikus yang diinduksi fluconazole menunjukkan dominasi folikel rambut dalam fase telogen, dengan sedikit folikel dalam fase anagen. Pada beberapa spesimen juga tampak adanya infiltrasi ringan sel inflamasi di sekitar folikel serta pelebaran dermis, yang menandakan adanya respon inflamasi lokal. Pewarnaan H&E mempermudah identifikasi morfologi jaringan dan diferensiasi fase pertumbuhan folikel rambut. Hasil ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menyebutkan bahwa obat sistemik tertentu dapat memicu peralihan siklus rambut dari fase anagen ke fase telogen secara prematur.

Conclusion

Pertama, pemberian fluconazole menunjukkan perlambatan pertumbuhan bulu pada tikus jika dibandingkan dengan kelompok tikus sehat. Kedua, kelompok tikus yang diinduksi dengan Flukonazole 35 mg selama 14 hari menyebabkan gangguan pada anagen follicle.

Recommendation

Penelitian selanjutnya melakukan Analisa molekuler parameter IL-10 dengan melihat dosis lebih besar terhadap tikus Wistar dengan model alopecia like yang diinduksi flukonazole.

References

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, 7471246.

Dasanders, J., & Bowen, M. (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, 861–867.

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.

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.

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, 260.

Safavi, K. H., Muller, S. A., Suman, V. J., Moshell, A. N., & Melton, L. J. (1995). Incidence of alopecia areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 through 1989. *Mayo Clinic Proceedings*, 70(7), 628–633.

Siiakma, V. K., Ol, C., Dawn, T., & Kumar, B. (n.d.). Profile of alopecia areata in Northern India. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology*.

Putra, A., Widyatmoko, A., Ibrahim, S., et al. (2021). Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Research*, 10, 228.

Xue, M., Zhang, X., Chen, J., et al. (2022). Mesenchymal stem cell-secreted TGF- β 1 restores Treg/Th17 skewing induced by lipopolysaccharide and hypoxia challenge via miR-155 suppression. *Stem Cells International*, 2022, 5522828.

Lee, Y. J., Park, S. H., Park, H. R., et al. (2021). Mesenchymal stem cells antagonize IFN-induced proinflammatory changes and growth inhibition effects via Wnt/ β -catenin and JAK/STAT pathway in human outer root sheath cells and hair follicles. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4598.

Deng, W., Zhang, Y., Wang, W., et al. (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, 335.

Putra, A., Ridwan, F. B., Putridewi, A. I., et al. (2018). The role of TNF- α induced MSCs on suppressive inflammation by increasing TGF- β and IL-10. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(10), 1779–1783.

Ho, C. H., Lan, C. W., Liao, C. Y., et al. (2018). Mesenchymal stem cells and their conditioned medium can enhance the repair of uterine defects in a rat model. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(3), 268–276.

Kuntardjo, N., Dharmana, E., Chodidjah, C., Nasihun, T. R., & Putra, A. (2019). TNF- α -activated MSC-CM topical gel effective in increasing PDGF level, fibroblast density, and *Journal of Nursing and Public Health (JONaPH)*, 2025, 1(1), 32-38

wound healing process compared to subcutaneous injection combination. *Majalah Kedokteran Bandung*, 51(1), 1–6.

Deng, W., Zhang, Y., Wang, W., et al. (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, 335.

Martinez-Lopez, A., Montero-Vilchez, T., Sierra-Sánchez, Á., Molina-Leyva, A., & Arias-Santiago, S. (2020). Advanced medical therapies in the management of non-scarring alopecia: Areata and androgenic alopecia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8186.

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.

Zhao, J., Hu, L., Liu, J., Gong, N., & Chen, L. (2013). The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts in vitro. *BioMed Research International*, 2013, 578479.

Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. G., & Wu, Y. (2008). Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE*, 3(4), e1886.

Roddy, G. W., Oh, J. Y., Lee, R. H., et al. (2011). Action at a distance: Systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF-α stimulated gene/protein 6. *Stem Cells*, 29(10), 1572–1579.

Jorgensen, C. (2010). Mesenchymal stem cells immunosuppressive properties: Is it specific to bone marrow-derived cells? *Stem Cell Research & Therapy*, 1(2), 15.

Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., et al. (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.

Sinclair, R. D. (2007). Healthy hair: What is it? *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 12, 2–5.

Kristiningrum, E. (2018). Continuing professional development: Suplemen untuk rambut sehat. *Majalah Farmasi Indonesia*, 45, 1–5.

Thompson, G. R. III, Krois, C. R., Affolter, V. K., et al. (2019). Examination of fluconazole-induced alopecia in an animal model and human cohort. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(7), e00177–19.

Matluobi, D., Araghi, A., Maragheh, B. F. A., et al. (2018). Carvacrol promotes angiogenic paracrine potential and endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells at low concentrations. *Microvascular Research*, 115, 20–27.

Kehl, D., Generali, M., Mallone, A., et al. (2019). Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: A systematic comparison of the angiogenic potential. *NPJ Regenerative Medicine*, 4(1), 8.

Putra, A., Pertiwi, D., Milla, M. N., et al. (2019). Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(3), 305–310.

Byun, J. W., Kim, H. J., Na, K., et al. (2017). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells prevent alopecia areata development through the inhibition of NKG2D expression: A pilot study. *Experimental Dermatology*, 26(6), 532–535.

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.

Tembhre, M. K., & Sharma, V. K. (2013). T-helper and regulatory T-cell cytokines in the peripheral blood of patients with active alopecia areata. *British Journal of Dermatology*, 169(3), 543–548.

Gautam, R. K., Singh, Y., Gupta, A., et al. (2020). The profile of cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A, and IL-23) in active alopecia areata. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1), 234–240.

Zhou, C., Li, X., Wang, C., & Zhang, J. (2021). Alopecia areata: An update on etiopathogenesis, diagnosis, and management. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 61(3), 403–423.

Pratt, C. H., King, L. E., Messenger, A. G., Christiano, A. M., & Sundberg, J. P. (2017). Alopecia areata. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17011.