

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **Latar Belakang**

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang menjadi salah satu penyebab utama kematian diseluruh dunia. TB disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dimana penularannya melalui *droplet* yang dibawa oleh udara ketika seseorang yang sakit TB batuk dan mengeluarkan bakteri.<sup>1</sup> Penyakit ini dapat disembuhkan namun pengobatannya cukup lama dimana membutuhkan waktu 6 bulan pengobatan dengan Obat Anti Tuberkulosis (OAT). TB yang resisten terhadap paling sedikit 2 jenis OAT (paling sering rifampisin dan isoniazid) disebut dengan *Multi Drug Resistance* (MDR TB). Hampir 5% dari semua kasus TB baru diseluruh dunia merupakan MDR TB.<sup>2</sup>

Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO) diperkirakan 10,6 juta orang menderita penyakit TB pada tahun 2021 meningkat dari tahun 2020. Secara global estimasi jumlah orang yang dengan MDR TB setiap tahunnya relatif stabil antara tahun 2015 hingga 2020, dan meningkat pada tahun 2021 yaitu naik 3,1% dari tahun 2020. Indonesia termasuk dalam tujuh negara dengan kasus MDR TB tertinggi di dunia.<sup>1</sup>

Pasien MDR TB yang sedang menjalankan pengobatan, mengkonsumsi minimal lima obat selama minimal 18 bulan, termasuk injeksi selama minimal delapan bulan untuk fase intensif (Falcon et al., 2011).<sup>2</sup> Beberapa tahun terakhir muncul tiga obat baru untuk pengobatan MDR TB yaitu bedaquiline (BDQ), delamanid (DLM), dan pretomanid (PTM). Pedoman WHO telah merekomendasikan pengobatan semua oral yang lebih singkat, tetapi pengobatan tersebut masih menganjurkan kombinasi tujuh obat dengan durasi yang cukup lama yaitu 9-12 bulan.<sup>3</sup> Data menunjukkan bahwa hanya 50-66% pasien dengan MDR TB yang menyelesaikan pengobatan dan masih bisa bertahan hidup. Lamanya durasi pengobatan dan

efek samping obat-obatan menyebabkan masalah besar dalam penanganan MDR TB. Kematian bukan hanya disebabkan oleh MDR TB saja, tetapi juga karena efek samping dari obat-obatan yang dikonsumsi dalam jangka waktu panjang.<sup>2,3</sup>

Hal tersebut mendorong para peneliti untuk menemukan pengobatan alternatif dalam menangani MDR TB, yaitu dengan menggunakan terapi seluler. Sel punca sering digunakan sebagai terapi seluler untuk menangani penyakit degeneratif dan penyakit infeksi.<sup>4</sup> Sel Punca Mesenkimal (*Mesenchymal stem cell /MSC*) merupakan salah satu jenis sel punca yang multipoten. Kemampuan regenerasi, kemampuan *homing*, dan kemampuan memodulasi imun (imunomodulator) yang dimiliki oleh MSC digunakan untuk memperbaiki jaringan rusak dan menekan inflamasi. Hal ini meningkatkan harapan penggunaan sel punca sebagai terapi seluler. MSC merupakan sel punca yang paling mudah diakses dan diisolasi dari berbagai jaringan, yaitu jaringan adiposa, tendon, kornea, timus, limpa, otak, hati, plasenta, cairan ketuban, pulpa gigi, sumsum tulang, *Wharton jelly* dari tali pusat dan dari berbagai sumber lainnya.<sup>4,5</sup>

MSC memiliki efek parakrin yang mengandung faktor pertumbuhan dan sitokin seperti (TGF- $\beta$ 3), faktor pertumbuhan hepatosit (HGF), sitokin proinflamasi seperti (TNF- $\alpha$ ), (IDO), dan (PGE2).<sup>6</sup> TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) disebut juga dengan sitokin multifungsi atau sitokin proinflamasi. TNF- $\alpha$  diproduksi oleh dendrit, makrofag, dan sel T. Sitokin ini berperan dalam rekrutmen sel fagositosis dengan menstimulasi atau mengaktifkan sel makrofag/dendrit lainnya dan merangsang mengaktifkan sel Th1 melalui IFN.<sup>7</sup> TNF- $\alpha$  tidak hanya merupakan sitokin proinflamasi yang kuat tetapi juga berperan penting dalam aktivasi dan migrasi leukosit, respon fase akut, proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis. Berdasarkan hal tersebut, TNF- $\alpha$  disebut juga sebagai sitokin *immunoregulator*.<sup>8</sup> TNF- $\alpha$  dapat mengaktifkan makrofag dan meningkatkan sekresi oksidan, seperti oksida nitrat dan superoksida yang dapat membunuh *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>9</sup>

Sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> saat ini juga banyak dikembangkan

untuk terapi seluler. Sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> asal darah tali pusat memiliki kemampuan angiogenik yang tinggi, mendukung plastisitas dan imunomodulator MSC. Sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> memberikan efek parakrin yang berfungsi dalam stimulasi angiogenesis dan rekrutmen *tissue-resident stem/progenitor cells* sehingga dapat meningkatkan proteksi jaringan dan memelihara fungsi organ.<sup>10</sup>

Salah satu kelemahan terapi seluler selama ini adalah pada viabilitas sel punca. Kematian sel terjadi sebelum sel mencapai target organ sehingga kemampuan diferensiasi dan regenerasi tidak dapat dilakukan dengan maksimal. Enkapsulasi sel punca dapat meningkatkan viabilitas dari sel punca tersebut yaitu dengan membungkus sel di dalam membran *semipermeabel*. Bahan yang biasa digunakan dalam enkapsulasi adalah alginat. Penggunaan alginat ini memiliki keuntungan yaitu mudah larut dalam air, ekonomis, biokompatibel, dan cepat menjadi gel dengan CaCl<sub>2</sub>.<sup>11,12</sup>

Enkapsulasi dengan alginat memberikan beberapa manfaat dalam terapi yaitu melindungi sel punca dari kondisi lingkungan mikro, seperti zat yang terkait dengan stres oksidatif dan inflamasi, serta melindungi dari adanya respon imun dari jaringan target. Enkapsulasi ini juga mempertahankan sekresi sitokin dan faktor pertumbuhan pada sel punca.<sup>11</sup>

Skrahin A, Jenkins HE, Hurevich H dkk menunjukkan bahwa pemberian MSC secara intravena memiliki potensi untuk memperbaiki jaringan paru-paru yang rusak dan meningkatkan respon imun pada penderita TB.<sup>13</sup> Hashemian SMR, Aliannejad M, Zarrabi M, dkk pada tahun 2021 menunjukkan bahwa pemberian MSC secara intravena dari plasenta relatif aman, dapat ditoleransi, dan dapat memperbaiki gejala pernapasan dan mengurangi kondisi peradangan pada beberapa pasien COVID-19.<sup>14</sup> Penelitian Aghayana dkk pada tahun 2022 menunjukkan bahwa pemberian MSC yang berasal dari plasenta secara intravena aman pada pasien dengan ARDS yang disebabkan oleh COVID-19.<sup>15</sup>

Mushahary D, Burja B, Spittler A dkk menunjukkan bahwa

pengobatan tuberkulosis berbasis MSC telah menunjukkan hasil yang positif, ditemukan bahwa sitokin seperti IFN dan TNF- $\alpha$  mengaktifkan makrofag dan meningkatkan sekresi oksidan seperti oksida nitrat dan superoksida, sehingga membunuh *Mycobacterium tuberculosis*, MSC dapat mengurangi pertumbuhan bakteri di paru-paru dan menghambat peradangan, serta mengurangi cedera pada paru-paru.<sup>9</sup>

Semakin meningkatnya kasus MDR TB dengan tingginya angka kegagalan pengobatan menyebabkan *urgensi* dalam menemukan pengobatan alternatif MDR TB. Adanya efek parakrin TNF- $\alpha$  dari sel punca sebagai imunomodulator memungkinkan penggunaan terapi seluler sebagai terapi alternatif MDR TB dan enkapsulasi memaksimalkan fungsi sel punca. Hal inilah melatarbelakangi penelitian studi preliminari ini dengan harapan bahwa hasil dari penelitian dapat menjadi dasar dalam pengembangan penggunaan sel punca sebagai terapi MDR TB.

### **Rumusan Masalah**

Bagaimanakah gambaran kadar TNF-  $\alpha$  pada mikroenkapsulasi MSC-CD34<sup>+</sup> sebagai studi preliminari terapi Seluler MDR TB?

### **Tujuan Penelitian**

#### **Tujuan Umum**

Untuk mengetahui gambaran kadar TNF-  $\alpha$  pada mikroenkapsulasi MSC-CD34<sup>+</sup> sebagai studi preliminari terapi seluler pada MDR TB.

#### **Tujuan Khusus**

Untuk mengetahui gambaran kadar TNF-  $\alpha$  pada mikroenkapsulasi MSC-CD34<sup>+</sup> pada hari ke-2, ke-7, ke-14 dan ke-21.

### **Manfaat penelitian**

#### **Bagi Peneliti**

Manfaat penelitian ini bagi peneliti adalah untuk menambah ilmu pengetahuan tentang kadar TNF-  $\alpha$  dengan mikroenkapsulasi MSC- CD34<sup>+</sup>

**Bagi Institusi**

Manfaat penelitian ini bagi institusi adalah untuk menambah ilmu pengetahuan mengenai bagaimana kadar TNF-  $\alpha$  mikroenkapsulasi MSC-CD34<sup>+</sup> sebagai terapi seluler MDR TB

**Bagi Masyarakat**

Manfaat penelitian ini bagi masyarakat adalah sebagai terapi seluler MDR TB jika berhasil.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tuberkulosis**

##### **2.1.1 Definisi Tuberkulosis**

Tuberculosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh basil *Mycobacterium tuberculosis* dan salah satu penyakit tertua di dunia yang menginfeksi manusia yang menjadi penyebab utama kematian menular di seluruh dunia. Tuberculosis termasuk dalam *communicable disease* (CD) dan secara global, TB menjadi penyebab utama kesembilan kematian global juga penyebab utama dari agen infeksi tunggal. Kemampuan bakteri ini untuk mengembangkan mutasi genetik yang memberikan resistensi terhadap sejumlah antibiotik yang sebelumnya efektif. Penyakit ini paling sering menyerang paru-paru dan dapat mempengaruhi bagian di luar paru (*extrapulmonary tuberculosis*). Penularan tuberkulosis dapat ditularkan dengan menghirup tetesan yang terinfeksi yang ada di udara dengan bersin, batuk, berbicara, atau meludah.<sup>16,17</sup>

Bakteri ini merupakan bakteri aerob berbentuk batang tipis yang tidak membentuk spora berukuran  $0,5 \mu \times 3 \mu$ . Dinding sel mikrobakteri, *lipid* (seperti, asam mikolat) terkait dengan arabinogalactan dan peptidoglikan yang mendasarinya. Struktur ini membuat dinding sel sangat kurang permeabel dan mengurangi efektivitas sebagian besar antibiotik. Saat bakteri ini berada dalam sifat dorman, bakteri ini dapat tahan terhadap udara kering maupun dingin. Bakteri dapat kembali aktif dari sifat dorman dan penyakit TB akan menjadi aktif kembali.<sup>18</sup> Basil tuberkel ini adalah organisme menular yang resisten, karena memiliki dinding sel lilin tebal yang memberikan perlindungan terhadap kekuatan eksternal dan inang.<sup>16</sup> Waktu yang diperlukan sejak masuknya kuman hingga timbulnya manifestasi dari infeksi TB yang disebut dengan masa inkubasi memerlukan waktu sekitar 6-

8 minggu.<sup>19</sup> Batuk kronis, produksi sputum, kehilangan nafsu makan, penurunan berat badan, demam, keringat malam, dan hemoptisis adalah tanda klinis khas TB paru. Pada orang dewasa yang tidak mengalami *immunocompromised* penyakit ini berkembang secara lambat, lain halnya pada anak-anak dan orang dengan gangguan kekebalan mungkin akan mengalami TB *fulminant* dan onset mendadak.<sup>20</sup>

### 2.1.2 Etiologi

TB yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* merupakan patogen udara yang dapat ditularkan dari individu ke individu lainnya melalui *droplet nuclei* ketika seorang penderita TB batuk, bersin, berteriak, atau bernyanyi.<sup>21</sup> *Droplet nuclei* yang menyebar di udara mempunyai diameter partikel yang berukuran 1-5 mikron dan mengandung *Mycobacterium tuberculosis*. Infeksi terjadi ketika seseorang menghirup droplet nukleus yang mengandung bakteri TB dan droplet nukleus melewati mulut atau saluran hidung, saluran pernapasan bagian atas, dan bronkus untuk mencapai alveoli. Infeksi TB sebagian besar menyerang paru-paru, tetapi dapat menyerang organ dan jaringan lain. Ketika bakteri memasuki inang, hal itu menyebabkan infiltrasi sel inflamasi, terutama di paru-paru, yang dapat menyebabkan pembentukan granuloma. *Mycobacterium tuberculosis* dapat menginfeksi berbagai jenis sel, termasuk neutrofil, makrofag, dan sel endotel. Setelah diambil oleh sel, bakteri dapat hadir di berbagai kompartemen intraseluler seperti fagosom dan *autofagosom*, dan ketika organel ini dihancurkan, bakteri TB juga mendapatkan akses ke sitosol. Pertumbuhan bakteri ini selama 2 sampai 10 minggu. Saat pertumbuhan bakteri sedang berlangsung maka akan muncul respon imun seluler yang dapat terdeteksi pada saat dilakukan pemeriksaan tes kulit tuberkulin.<sup>22</sup>

### 2.1.3 Epidemiologi *Multi Drug Resistance Tuberculosis*

Angka kejadian TB di seluruh dunia pada akses diagnosis dan

pengobatan TB berdampak buruk karena adanya pandemi COVID-19. Dimana didapatkan adanya penurunan laju kejadian yang telah didiagnosis TB. Pada tahun 2019 sekitar 7,1 juta orang terinfeksi TB dan pada tahun 2020 mengalami penurunan 18% menjadi 5,8 juta kasus TB. Tiga negara yang paling banyak menyumbang penurunan pada tahun 2020 adalah India, Indonesia, dan Filipina (67% dari total global). Hal ini dikarenakan setiap orang menjalankan protokol kesehatan dalam penurunan kasus terinfeksi COVID-19. Penularan COVID-19 dan TB sama-sama melalui *droplet* dari batuk atau bersin orang yang terinfeksi COVID-19 atau TB itu sendiri.<sup>1</sup>

Pada tahun 2020 terdapat 30 negara dengan beban TB tinggi menyumbang 86% dari semua perkiraan kasus insiden di seluruh dunia, dan delapan dari negara-negara ini menyumbang dua pertiga dari total jumlah kasus TB di seluruh dunia, yaitu Indonesia (8,4%), India (26%), China (8,5%), Pakistan (5,8%), Filipina (6,0%), Bangladesh (3,6%), Nigeria (4,6%) dan Afrika Selatan (3,3%). Secara geografis, pada tahun 2020 Persentase kejadian TB sebagian besar berada di wilayah Asia Tenggara (43%), Afrika (25%), dan Pasifik Barat (18%), lalu diikuti dengan presentase yang lebih kecil ada Mediterania Timur (8,3%), Amerika (3,0%) dan Eropa (2,3%).<sup>23</sup>

Pada tahun 2021, sebagian besar negara yang menyumbang angka kejadian TB yaitu Asia Tenggara (45%), Afrika (23%) dan Pasifik Barat (18%), dengan proporsi yang lebih kecil di Mediterania timur (8,1%), Amerika (2,9%) dan Eropa (2,2%). Dan 30 negara dengan beban kasus TB tertinggi dari semua kasus insiden di seluruh dunia, dimana delapan diantaranya menyumbang lebih dari dua pertiga dari total global: India (28%), Indonesia (9,2%), Cina (7,4%), Filipina (7,0%), Pakistan (5,8%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) dan Republik Demokratik Kongo (2,9%).<sup>1</sup>

TB yang resisten terhadap obat menjadi ancaman kesehatan masyarakat. MDR TB resisten terhadap rifampisin dan isoniazid yang merupakan obat lini pertama yang cukup efektif. Secara global, estimasi



jumlah orang yang terkena MDR TB setiap tahun adalah relatif stabil antara tahun 2015 dan 2020, namun tumbuh pada tahun 2021 . Diperkirakan ada 450.000 kasus, naik 3,1% dari 437.000 pada tahun 2020.<sup>1</sup>

Khususnya di Indonesia terjadi penurunan pada tahun 2020 ada sekitar 351.936 kasus TB sedangkan pada tahun 2019 ada sekitar 568.987 kasus TB. Dilaporkan tiga provinsi yang memiliki kasus tertinggi karena memiliki jumlah penduduk yang sangat banyak yaitu Jawa Barat, Jawa Timur, dan Jawa Tengah. Dari ketiga provinsi ini didapatkan kasus TB tersebut mencapai (46%) dimana angka tersebut hampir mencapai setengah dari kasus tuberkulosis di Indonesia. Pada tahun 2020 kasus TB terbanyak ditemukan pada kelompok usia 45 – 54 tahun yaitu sebesar 17,3%, setelah itu diikuti oleh kelompok usia 25 – 34 tahun sebesar 16,8% dan diikuti kelompok usia 15 – 24 tahun 16,7%. Menurut data profil kesehatan Indonesia tahun 2019 jumlah kasus TB yang terjadi pada laki-laki lebih tinggi dari pada perempuan secara nasional dan di semua provinsi di Indonesia. Bahkan di Aceh, Sumatera Utara, dan Sulawesi Utara kasus TB sendiri pada laki-laki hampir dua kali lipat dibandingkan perempuan.<sup>24</sup>

#### **2.1.4 Tanda dan Gejala Tuberkulosis**

Tanda dan Gejala dari TB dibagi 2 yaitu yang TB paru dan TB luar paru :

- TB Paru : Batuk terus-menerus (produktif) yang (berlangsung 3 minggu atau lebih) dengan atau tanpa dahak, hemoptisis (batuk darah), Nyeri dada, Kehilangan nafsu makan, penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan, keringat di malam hari, demam, kelelahan atau mudah lelah
- Tuberkulosis luar paru : TB ginjal dapat menyebabkan urin berdarah, meningitis TB dapat menyebabkan sakit kepala atau kebingungan. TB kulit dimana terdapat skrofuloderma dimulai dengan pembesaran kelenjar getah bening. Meningitis TB dengan gejala nyeri kepala hebat, demam, fotofobia. TB tulang dapat menyebabkan sakit punggung, TB laring dapat menyebabkan suara serak, Kehilangan nafsu makan,

penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan, keringat di malam hari, demam, kelelahan atau mudah lelah.<sup>20,25</sup>

### 2.1.5 Penegakan Diagnosis Tuberkulosis

Diagnosis pasti TB melibatkan penilaian *Mycobacterium tuberculosis* basil dengan metode mikrobiologi, sitopatologi atau histopatologi. Pendekatan laboratorium klasik untuk diagnosis infeksi mikobakteri melibatkan karakterisasi fenotipik koloni yang tumbuh di media *lowenstein jensen*. Diagnosis tuberkulosis dapat ditegakkan dengan beberapa pemeriksaan antara lain sebagai berikut.<sup>26</sup>

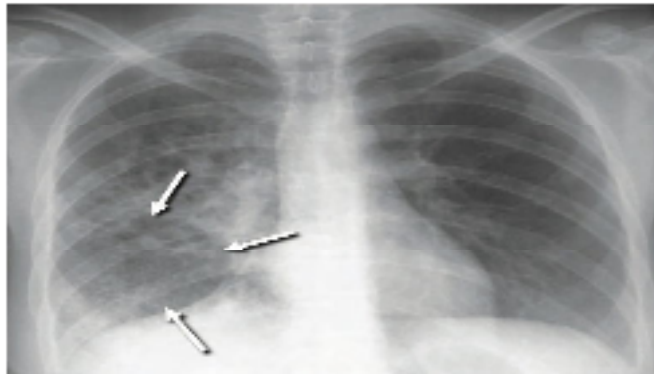
*Tuberculin skin testing* dan *interferon- $\gamma$  release assays* : Tes ini membantu dokter membedakan orang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan mereka yang tidak terinfeksi. Namun, reaksi negatif terhadap salah satu tes tidak mengecualikan diagnosis penyakit TB atau LTBI.



**Gambar 2.1** Sediaan tes untuk infeksi *Mycobacterium tuberculosis*<sup>25</sup>

- **Radiografi Thoraks** : Posisi radiografi toraks yang sering digunakan adalah posisi *Posteroanterior* dan *lateral*. Posisi ini biasanya sering digunakan pada penegakan diagnosis TB *pulmonal*, *pleural* dan *milier*.<sup>27</sup> Pada penyakit TB paru, kelainan radiografi sering terlihat pada segmen apikal dan *posterior lobus* atas atau pada segmen *superior lobus* bawah. Namun, lesi dapat muncul di mana saja di paru-paru dan mungkin berbeda dalam ukuran, bentuk, densitas, dan kavitas, terutama pada orang yang terinfeksi HIV dan orang dengan immunosupresi lainnya. Kelainan radiografi pada anak-anak cenderung minimal dengan

kemungkinan limfadenopati yang lebih besar, lebih mudah didiagnosis pada film lateral.<sup>25</sup> Gambaran pada TB milier terdapat bercak-bercak halus yang tersebar diseluruh lapangan paru.<sup>18</sup>

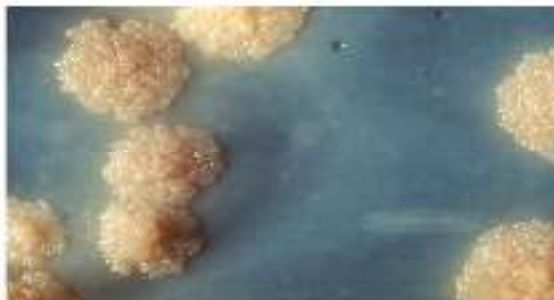


**Gambar 2.2 Radiografi Dada dengan Rongga Lobus Bawah<sup>25</sup>**

- Pemeriksaan Bakteriologis Spesimen Klinis: Pemeriksaan spesimen klinis (misalnya, dahak, urin, atau cairan serebrospinal) sangat penting untuk diagnostik. Spesimen harus diperiksa dan dibiakkan di laboratorium yang berspesialisasi dalam pengujian *Mycobacterium tuberculosis*. Pemeriksaan bakteriologis memiliki lima bagian yaitu :
  - a) Pengumpulan pemrosesan dan peninjauan spesimen : Untuk tujuan diagnostik, semua orang yang diduga menderita penyakit TB di tempat manapun harus diambil sputumnya untuk kultur TB. Setidaknya diperlukan tiga spesimen dahak berturut-turut masing-masing dikumpulkan dalam 8 hingga 24 hari.
  - b) Klasifikasi dan hasil BTA : Deteksi basil tahan asam pada apusan yang diwarnai dan dicuci asam diperiksa secara mikroskopis dapat memberikan bukti bakteriologis pertama dari keberadaan mikobakteri dalam spesimen klinis. Acuan standar baku pada kultur yang menemukan BTA untuk saat ini hanya dibutuhkan 10-100 basil *Mycobacterium tuberculosis* untuk mendiagnosis TB.<sup>28</sup> Metode kultur ini membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mendapatkan hasil sekitar 2-8 minggu.
  - c) Deteksi langsung dari *Mycobacterium tuberculosis* dalam spesimen

klinis menggunakan amplifikasi asam nukleat (NAA) : Tes NAA digunakan untuk memperkuat segmen DNA dan RNA untuk mengidentifikasi mikroorganisme dengan cepat dalam spesimen. Pengujian NAA dapat mendeteksi dengan andal *Mycobacterium tuberculosis* bakteri dalam spesimen dalam hitungan jam dibandingkan dengan 1 minggu atau lebih untuk biakan

- d) Pemiakan dan identifikasi spesimen : Kultur tetap menjadi standar emas untuk konfirmasi laboratorium penyakit TBC, dan pertumbuhan bakteri diperlukan untuk melakukan pengujian kerentanan obat dan genotipe. Pemeriksaan kultur harus dilakukan pada semua diagnostik spesimen, terlepas dari hasil BTA atau NAA. Kultur positif untuk *Mycobacterium tuberculosis* mengkonfirmasi diagnosis penyakit TBC. Namun, dengan tidak adanya kultur positif, penyakit TB juga dapat didiagnosis berdasarkan tanda dan gejala klinis saja.



**Gambar 2.3 koloni dari *Mycobacterium tuberculosis* dalam pemiakan<sup>25</sup>**

- e) Tes kepekaan terhadap obat : Untuk semua pasien, yang terinfeksi *M.tuberculosis* isolat harus diuji resistensinya terhadap obat anti-TB lini pertama: isoniazid, rifampisin, etambutol, dan pirazinamid. Dimana Seorang pasien didiagnosis dengan penyakit TB yang resistan terhadap berbagai obat (MDR TB) jika organisme tersebut resisten terhadap setidaknya isoniazid dan rifampisin, dua OAT (Obat Anti Tuberculosis) lini pertama yang paling manjur.<sup>25</sup>
- Amplifikasi Asam Nukleat : Salah satu tes amplifikasi asam nukleat yang terbaik dan terbanyak dilakukan adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang saat ini sangat umum digunakan untuk

menegakkan diagnosa dengan cepat untuk beberapa penyakit menular, salah satunya adalah tuberkulosis. Amplifikasi gen PCR yang diketahui terkait dengan resistensi obat dapat diikuti dengan pengurutan DNA yang dapat mendeteksi mutasi.<sup>25</sup>

### 2.1.6 Tatalaksana Tuberkulosis

Pengobatan dilakukan untuk mengobati pasien per individu, dimana untuk meminimalkan resiko morbiditas dan mortalitas terkait pengobatan, mengurangi infeksi tuberkulosis, dan untuk mencegah resistensi terhadap obat. Prinsip pengobatan yang adekuat harus memenuhi hal-hal sebagai berikut.<sup>29</sup>

- Pengobatan diberikan dalam bentuk paduan OAT yang tepat mengandung minimal 4 macam obat untuk mencegah terjadinya resistensi
- Diberikan dalam dosis yang tepat
- Ditelan secara teratur dan diawasi secara langsung oleh PMO (pengawas menelan obat) sampai selesai masa pengobatan. Pengobatan diberikan dalam jangka waktu yang cukup terbagi dalam tahap awal serta tahap lanjutan untuk mencegah kekambuhan.<sup>30</sup>

*Centers for Disease Control* (CDC) merekomendasikan DOT (Terapi observasi langsung ) untuk semua pasien dengan tuberkulosis yang resistan terhadap obat dan untuk pasien yang menerima pengobatan intermiten (2 atau 3 kali seminggu). Tahap pengobatan TB paru terdiri dari 2 tahap yaitu<sup>31</sup> :

- Tahap awal

Pengobatan diberikan setiap hari. Paduan pengobatan pada tahap ini adalah dimaksudkan untuk secara efektif menurunkan jumlah kuman yang ada dalam tubuh pasien dan meminimalisir pengaruh dari sebagian kecil kuman yang mungkin sudah resistan sejak sebelum pasien mendapatkan pengobatan. Pengobatan tahap awal pada semua pasien baru, harus diberikan selama 2 bulan. Yaitu diberikan isoniazid (INH),

rifampisin (RMP), etambutol (EMB), dan pirazinamid (PZA).

- Tahap lanjutan

Pengobatan tahap lanjutan bertujuan membunuh sisa-sisa kuman yang masih ada dalam tubuh, khususnya kuman persisten sehingga pasien dapat sembuh dan mencegah terjadinya kekambuhan. Durasi tahap lanjutan selama 4 bulan. Yaitu diberikan isoniazid (INH), rifampisin (RMP), Pada fase lanjutan seharusnya obat diberikan setiap hari.<sup>30</sup>

### 2.1.7 Komplikasi dan Prognosis

Beberapa komplikasi yang terkait dengan tuberkulosis adalah:

- Kerusakan paru-paru yang luas (*Extensive lung destruction*)
- Kerusakan ganglia simpatik serviks yang mengarah ke *Horner's syndrome*.
- *Acute respiratory distress syndrome*
- Penyebaran miliar (tuberkulosis diseminata) termasuk meningitis TB
- Empyema
- Pneumothorax
- *Systemic amyloidosis*<sup>32</sup>

Untuk prognosis sendiri Hampir semua pasien imunokompeten dengan tuberkulosis yang dirawat dengan baik dapat disembuhkan. Tingkat kekambuhan kurang dari 5% dengan rejimen saat ini. Penyebab utama kegagalan pengobatan adalah ketidakpatuhan terhadap terapi.<sup>29</sup>

Tanpa pengobatan angka kematian untuk tuberkulosis lebih dari 50%. Kelompok pasien berikut lebih rentan terhadap hasil yang lebih buruk atau kematian setelah infeksi TB:

- Ekstrem usia, lanjut usia, bayi, dan anak-anak Keterlambatan
- dalam menerima pengobatan
- Bukti radiologis kerusakan penyebaran luas pada paru (*Extensive lung destruction*)
- *Respiratory compromise* yang membutuhkan ventilasi mekanis
- Imunosupresi

- *Multidrug Drug Resistance Tuberculosis*<sup>32</sup>

## **2.2 Multi Drug Resistance Tuberculosis**

### **2.2.1 Klasifikasi Tuberkulosis Resisten Obat**

Tuberkulosis yang resisten terhadap obat dibagi menjadi 3 yaitu :

- *Multi Drug Resistance TB* (MDR TB) dimana disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium Tuberculosis* yang resisten terhadap setidaknya isoniazid dan rifampisin, dua obat TB yang paling manjur. Obat ini digunakan untuk mengobati semua orang dengan penyakit TB.
- *Tuberculosis Pre-Extensive Drug Resistant* (TB pre-XDR) dimana disebabkan oleh bakteri TB yang resisten terhadap isoniazid, rifampisin, dan fluoroquinolone atau oleh bakteri TB yang resisten terhadap isoniazid, rifampisin, dan obat sekunder.
- *Extensive drug-resistant TB* (XDR TB) dimana jenis MDR TB langka yang disebabkan oleh bakteri TB yang resisten terhadap isoniazid dan rifampisin, fluoroquinolon, dan suntikan lini kedua (amikasin, kapreomisin, dan kanamisin) atau oleh bakteri TB yang resisten terhadap isoniazid, rifampisin, fluoroquinolone, dan bedaquiline atau linezolid.<sup>33</sup>

### **2.2.2 Definisi Multi Drug Resistance Tuberculosis**

MDR TB didefinisikan sebagai TB yang disebabkan oleh basil *Mycobacterium Tuberculosis* yang resisten terhadap rifampisin (RIF) dan isoniazid (INH) yang menjadi OAT lini pertama yang paling ampuh.<sup>3,33</sup> Meskipun ketersediaan pengobatan medis meningkat, tantangan baru telah berkembang dengan meningkatnya insiden tuberkulosis yang resisten terhadap obat yang meliputi DR-TB (resisten obat), MDR TB (resisten terhadap banyak obat), XDR-TB (resisten terhadap obat secara ekstensif), XXDR-TB (sangat resisten obat), dan TDR-TB (resisten total obat).<sup>17</sup> Faktor utama yang bertanggung jawab atas terjadinya KLB MDR TB adalah ketidakpatuhan pasien selama pengobatan, resep yang tidak tepat, koinfeksi

HIV, terapi yang tidak efektif karena keterlambatan identifikasi resistensi obat, dan juga karena ekonomi negara yang buruk dan kurangnya dukungan sosial. MDR TB juga terjadi ketika pasien tidak menyelesaikan obat yang diresepkan sepenuhnya dan pengobatan MDR TB agak mahal untuk masyarakat umum.<sup>34</sup>

### **2.2.3 Faktor Resiko *Multi Drug Resistance Tuberculosis***

Beberapa orang terkena TB segera setelah terinfeksi (dalam beberapa minggu) sebelum sistem kekebalan tubuh mereka dapat melawan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Dan beberapa orang juga bisa menderita penyakit bertahun-tahun kemudian, ketika sistem kekebalan tubuh mereka melemah maka infeksi mudah terjadi. Bagi orang yang sistem kekebalan tubuhnya lemah, terutama mereka yang terinfeksi HIV, risiko mengembangkan penyakit TB jauh lebih tinggi daripada orang dengan sistem kekebalan yang normal.<sup>35</sup>

Secara umum, orang yang berisiko tinggi terkena penyakit TB terbagi dalam dua kategori yaitu: Orang yang baru saja terinfeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan Orang dengan kondisi medis yang melemahkan sistem kekebalan tubuh. Dimana orang yang baru terinfeksi bakteri TB ini termasuk; Orang yang bermigrasi dari wilayah dunia dengan tingkat TB yang tinggi, Kelompok dengan tingkat penularan TB yang tinggi, seperti gelandangan, pengguna narkoba suntikan, dan pengidap HIV, Orang yang bekerja atau tinggal dengan orang yang berisiko tinggi terhadap TB di fasilitas atau institusi seperti rumah sakit, tempat penampungan tunawisma, lembaga pemasyarakatan, panti jompo, dan panti jompo bagi penderita HIV. Sedangkan orang dengan kondisi medis yang melemahkan sistem kekebalan tubuh, seperti orang-orang yang terinfeksi HIV, Diabetes, berat badan rendah, transplantasi organ, penyalahgunaan zat, penyakit keganasan, penyakit autoimun.<sup>35,36</sup>

Dimana untuk kasus MDR TB sendiri prediktor paling kuat dari adalah riwayat pengobatan atau keteraturan minum obat. Pasien yang



mempunyai riwayat kegagalan pengobatan TB memiliki kemungkinan lebih besar menjadi pasien MDR TB. Hal ini dapat diartikan bahwa kepatuhan berobat memegang peran vital dalam menentukan keberhasilan program pengobatan TB. Kejadian MDR TB disebutkan merupakan masalah global yang terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun, dimana salah satu penyebabnya adalah ketidakpatuhan pasien selama menjalani program pengobatan. Dimana hambatan-hambatan yang menyebabkan riwayat pengobatan tersebut seperti pendapatan keluarga perbulan dimana Adapun bertani merupakan salah satu prediktor MDR TB disamping riwayat kontak TB sebelumnya, penggunaan alkohol serta infeksi HIV, pengangguran atau tidak memiliki pekerjaan, Keterlambatan diagnosis dan pengobatan yang memberikan dampak negatif pada tingkat kesembuhan dan membuatnya lebih sulit mengendalikan penyebarannya, Jarak tempat tinggal yang jauh dari fasilitas kesehatan dimana pasien yang berdomisili di wilayah perkotaan memiliki faktor resiko lebih besar menderita MDR TB dibanding mereka yang tinggal di wilayah pedesaan, Lokasi rumah tempat tinggal yang berjarak lebih dari 5 km dari tempat perawatan TB dimana hal tersebut dikaitkan dengan minimnya ongkos transportasi. Sebuah studi yang pernah dilakukan di Ehiopia menjelaskan bahwa peluang berkembangnya kasus MDR TB lebih tinggi terjadi pada pasien lama, yaitu sebelumnya pernah mendapatkan terapi obat anti-TB. Studi di Beijing mengungkapkan bahwa peningkatan kasus MDR TB dipengaruhi banyak faktor diantaranya tidak tuntas dan kegagalan pengobatan TB sebelumnya.<sup>37</sup>

#### **2.2.4 Penegakan Diagnosa *Multi Drug Resistance Tuberculosis***

Semua pasien yang terduga TB harus menjalani pemeriksaan bakteriologis untuk mengkonfirmasi penyakit TB. WHO merekomendasikan pemeriksaan biakan dan uji kepekaan minimal terhadap rifampisin dan isoniazid pada kelompok pasien berikut:

- Semua pasien dengan riwayat pengobatan OAT. Hal ini dikarenakan TB resistan obat banyak ditemukan terutama pada pasien yang memiliki

riwayat gagal pengobatan sebelumnya.

- Semua pasien dengan HIV yang didiagnosis TB aktif. Khususnya mereka yang tinggal di daerah dengan prevalensi TB resisten obat yang tinggi.
- Pasien dengan TB aktif yang terpajan dengan pasien TB resisten obat.
- Semua pasien baru di daerah dengan kasus TB resisten obat primer >3%.
- Pasien baru atau riwayat OAT dengan sputum BTA tetap positif pada akhir fase intensif. Sebaiknya dilakukan pemeriksaan sputum BTA pada bulan berikutnya.

Pemeriksaan biakan dan uji kepekaan dapat dilakukan dengan 2 metode :

- a) Metode Konvensional Uji Kepekaan Obat : Pemeriksaan biakan *Mycobacterium tuberculosis* dapat dilakukan menggunakan 2 macam medium padat (*Lowenstein Jensen /LJ* atau *Ogawa*) dan media cair MGIT (*Mycobacterium growth indicator tube*). Biakan *Mycobacterium tuberculosis* pada media cair memerlukan waktu yang singkat minimal 2 minggu, lebih cepat dibandingkan biakan pada medium padat yang memerlukan waktu 28-42 hari.
- b) Metode cepat uji kepekaan obat (uji diagnostik molekular cepat) : Pemeriksaan molekular untuk mendeteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* saat ini merupakan metode pemeriksaan tercepat yang sudah dapat dilakukan di Indonesia. Metode molekular dapat mendeteksi mutasi pada gen yang berperan dalam mekanisme kerja OAT lini 1 dan lini 2. WHO merekomendasikan penggunaan Xpert MTB/RIF untuk deteksi resisten rifampisin. Pemeriksaan dengan TCM (Tes Cepat Molekuler) dapat mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan gen pengkode resisten rifampisin (*rpoB*) pada sputum kurang lebih dalam waktu 2 (dua) jam. Konfirmasi hasil uji kepekaan OAT menggunakan metode konvensional masih digunakan sebagai baku emas (gold standard).<sup>30</sup>

### **2.2.5 Tatalaksana *Multi Drug Resistance Tuberculosis***

Durasi BDQ 9-12 bulan (digunakan selama 6 bulan),

levofloxacin/moksifloksasin, etionamid, etambutol, INH (dosis tinggi), pirazinamid, dan CFZ selama 4 bulan (dengan kemungkinan diperpanjang hingga 6 bulan jika pasien tetap BTA positif pada akhir 4 bulan), diikuti dengan 5 bulan pengobatan dengan levofloxacin/moksifloksasin, CFZ, etambutol, dan pirazinamid. Rejimen ini direkomendasikan untuk pasien yang belum terpapar pengobatan dengan OAT lini kedua selama lebih dari 1 bulan dan yang resistansi terhadap fluoroquinolones telah disingkirkan.<sup>3</sup>

Regimen yang bertahan 18-20 bulan terdiri dari ketiga agen Grup A (yaitu, BDQ, levofloxacin/ moksifloksasin, dan LZD) dan setidaknya satu agen Grup B (yaitu, cycloserine dan CFZ) untuk memastikan setidaknya empat agen TB yang mungkin menjadi efektif dan setidaknya tiga agen dimasukkan untuk sisa pengobatan jika BDQ dihentikan. Kedua agen Grup B harus disertakan jika hanya satu atau dua agen Grup A yang digunakan. Jika rejimen tidak dapat terdiri dari agen Grup A dan B saja, Grup C (yaitu, etambutol, DLM, pirazinamid, imipenem-silastatin atau meropenem, amikasin (atau streptomisin), etionamid atau protionamid, dan asam p-aminosalisilat) ditambahkan untuk melengkapinya. Pada anak-anak, durasi terapi tergantung pada lokasi dan tingkat keparahan penyakit: penyakit yang tidak parah dapat diobati selama 9-12 bulan, sedangkan penyakit yang parah dapat diobati selama 9-12 bulan. Penyakit akan membutuhkan 12-18 bulan terapi. Vitamin B6 harus diberikan kepada semua anak yang menerima terapi TB MDR. Sebuah rejimen 6-9 bulan BDQ, PTM, dan LZD di bawah penelitian operasional pada pasien dengan resistensi terhadap fluoroquinolones yang belum menerima pengobatan sebelumnya dengan BDQ dan LZD selama lebih dari 2 minggu.<sup>3</sup>

Regimen	Composition	Total Duration	Observations
Long MDR TB	6 months > 4 drugs (3 group A + 1 – 2 group B) 12–14 months and 3 drugs (BDQ/AMK/DLM stop) **	18–20 *	At least 4 effective drugs at the beginning LZD at least 6 months
Short MDR TB	4–6 months > Km † + MFX + CFZ + ETO + Z + E + High-Dose INH 5 months > MFX + CFZ + Z + E	9–12	Exclusion: >1 previous month on any of these drugs, extrapulmonary TB in persons living with HIV, miliary TB or TB meningitis
	4–6 months > BDQ + MFX + CFZ + ETO + Z + E + High-Dose INH 5 months > MFX + CFZ + Z + E	9–12	Exclusion: Extensive pulmonary TB, miliary or TB meningitis, resistance to fluoroquinolones
	BDQ + PTM + LZD	6–9	XDR or MDR with no alternative regimen

**Gambar 2.4 Regimen MDR dan XDR TB Rekomendasi WHO3**

BDQ: bedaquiline, AMK: amikacin, DLM: delamanid, Km: kanamicin, Mfx: moxifloxacin, CFZ: clofazimine, ETO: ethionamid, Z: pyrazinamid, E: ethambutol, INH: isoniazid, TB: tuberculosis, HIV: human immunodeficiency virus, LZD: linezolid.\*Anak-anak dengan penyakit tidak parah dapat dirawat selama 9–12 bulan, sementara anak dengan penyakit parah membutuhkan 12–18 bulan \*\* BDQ dan DLM dapat dipertimbangkan untuk digunakan lebih dari 6 bulan. †Kanamisin dalam uji coba *STREAM*. Namun tetap dipertimbangkan, pedoman yang merekomendasikan penggunaan kanamicin.

### 2.3 Sel Punca

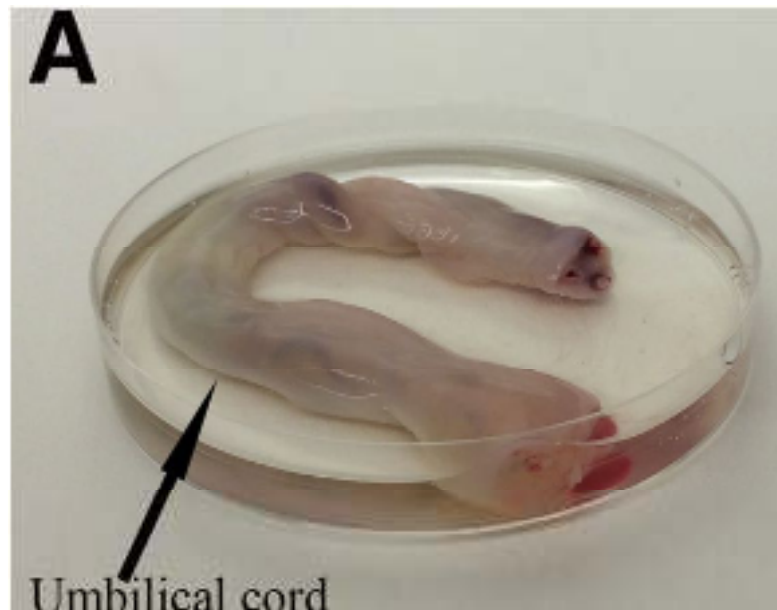
Sel punca adalah sel tubuh manusia yang belum terspesialisasi dan dapat berkembang menjadi sel yang terspesialisasi dan memiliki fungsi baru. Sel punca ini memiliki dua karakteristik yang khas, 1) memiliki kemampuan untuk memperbarui dirinya sendiri (*self renewal*) melalui pembelahan sel secara mitotik dan 2) memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai macam tipe sel, jaringan, maupun organ yang spesifik. Sel punca berperan penting untuk perkembangan, pertumbuhan, pemeliharaan, dan perbaikan sel maupun jaringan di otak, tulang, otot, saraf, darah, kulit, dan organ-organ tubuh yang lain. Karena kedua sifat tersebut, sel punca sangat potensial

untuk dikembangkan sebagai pengobatan regeneratif pada berbagai penyakit.<sup>5</sup>

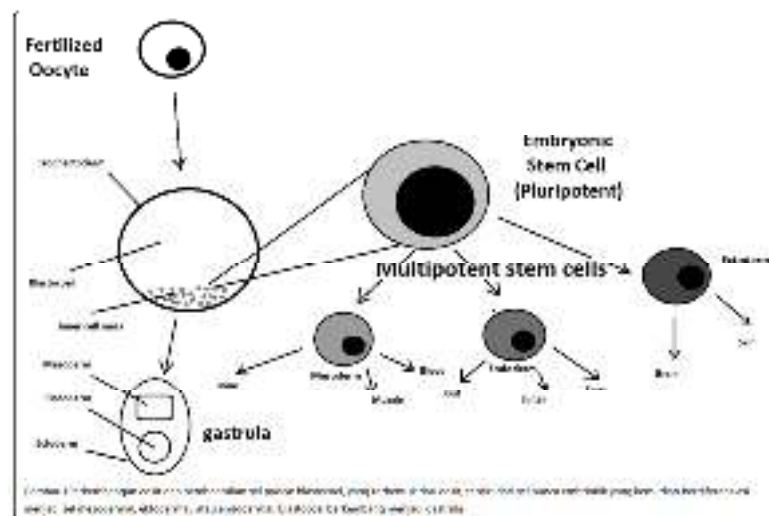
### 2.3.1 Sel Punca Mesenkimal

Sel Punca Mesenkimal merupakan salah satu jenis sel punca yang bersifat multipoten. MSC adalah sel stroma vaskular yang dapat dengan mudah berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel termasuk osteoblas, kondrosit, dan adiposit. MSC diisolasi dari beberapa sumber jaringan manusia, termasuk gigi molar tiga rahang bawah, matriks tali pusat, darah tali pusat, *Wharton Jelly*, sumsum tulang belakang, dan jaringan adiposa.<sup>5</sup> MSC memiliki keuntungan seperti ketersediaan yang memadai, akses yang mudah, proliferasi cepat, diferensiasi multipoten dan keberhasilan integrasi dan toleransi imunologis pada host. Sifat imunomodulator MSC yang baik merupakan keuntungan dalam penerapan terapi berbasis sel untuk berbagai penyakit. Penanda permukaan yang sering digunakan sebagai karakteristik MSC adalah CD73, CD90, CD105.<sup>5,38</sup>

MSC mampu memproduksi protein dan sitokin untuk perbaikan jaringan, zat imunomodulator yang dapat menekan inflamasi karena luka maupun karena penolakan transplantasi jaringan oleh tubuh, serta sifat proangiogenik yang berpotensi untuk terapi. MSC memiliki efek parakrin yang mengandung faktor pertumbuhan dan sitokin dalam sekretom seperti (TGF- $\beta$ 3), faktor pertumbuhan hepatosit (HGF), sitokin proinflamasi seperti (IL-10), (TNF- $\alpha$ ), (IDO), dan (PGE2). Meskipun demikian, proses isolasi MSC tidak selalu berhasil. Jika proses penanaman kurang baik, maka sel-sel yang ditransplantasikan menjadi kehilangan efek terapeutiknya. Hal inilah yang menjadi keterbatasan terapi berbasis sel.<sup>5</sup>



Gambar 2.5 Umbilical Cord<sup>39</sup>



Gambar 2.6 Perkembangan oosit dan pembentukan sel punca<sup>40</sup>

### 2.3.2 Sel Punca Hematopoietik CD34<sup>+</sup>

Sel punca hematopoietik adalah sel multipoten yang memiliki banyak fungsi. Sel punca hematopoietik merupakan unit fungsional hematopoiesis untuk perbaikan diri dan galur multilini. Sel punca hematopoietik mampu membentuk seluruh progenitor sel darah untuk hematopoiesis termasuk

eritrosit, leukosit, dan trombosit dan sistem imun tubuh. Sel punca hematopoietik merupakan diferensiasi hemangioblast, yang juga dapat berdiferensiasi menjadi progenitor sel endotel. Hal ini menyebabkan sel punca hematopoietik memiliki beberapa kesamaan sifat ekspresi protein permukaan dengan progenitor sel endotel. Isolasi sel punca hematopoietik dapat dilakukan dari darah tepi, darah tali pusat, dan sumsum tulang. Salah satu penanda permukaan menonjol yang banyak digunakan untuk mengisolasi progenitor hematopoietik dari populasi heterogen adalah CD34<sup>+</sup>.<sup>41</sup> Efek parakrin dari Sel punca hematopoietik CD34 melibatkan banyak target, diantaranya stimulasi angiogenesis, atenuasi fibrosis, dan rekrutmen *tissue-resident stem/progenitor cells* sehingga dapat meningkatkan proteksi jaringan dan memelihara fungsi organ.<sup>10</sup>

## **2.4 Enkapsulasi Sel Punca**

### **2.4.1 Defenisi**

Mikroenkapsulasi adalah teknologi untuk melapisi suatu zat inti dengan suatu lapisan dinding polimer sehingga menjadi partikel-partikel berukuran mikro. Bahan inti dapat berupa padatan, cairan, dan gas. Mikroenkapsulasi yang terbentuk dapat berupa partikel tunggal atau bentuk agregat yang biasanya memiliki rentang ukuran 5-5000 mikrometer. Komponen mikroenkapsulasi terdiri atas bahan inti, bahan pelapis dan juga pelarut.<sup>42</sup>

### **2.4.2 Jenis Enkapsulasi**

Jenis enkapsulasi yang sering digunakan adalah mikrokapsul berisi sel mononuklear dari bahan polimer biokompatibel seperti alginat. Mikrokapsul alginat *semi-permeabel* ini tidak menunjukkan toksisitas untuk sel punca itu sendiri, sehingga sudah banyak penelitian yang menggunakan mikroenkapsulasi dengan alginat ini. Penggunaan alginat ini memiliki keuntungan yaitu mudah larut dalam air, ekonomis, biokompatibel, dan

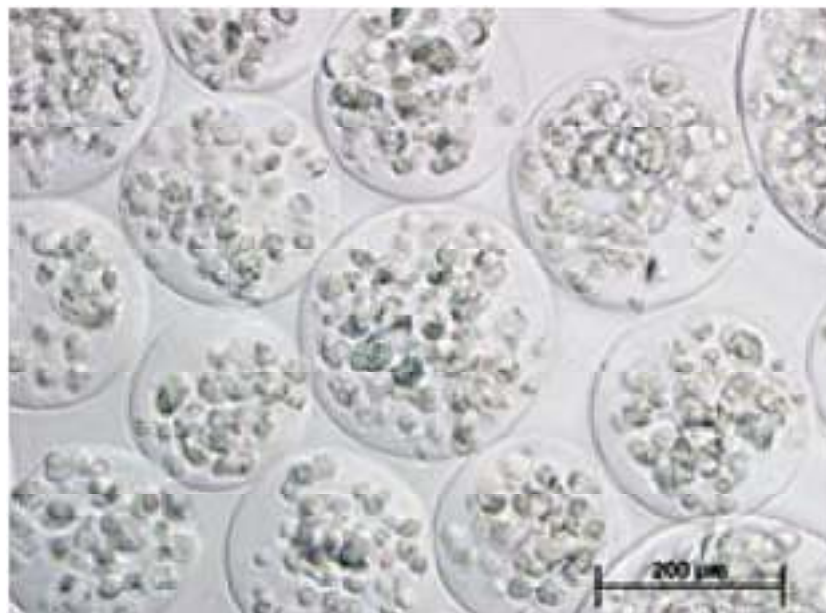
cepat menjadi gel dengan  $\text{CaCl}_2$ .<sup>11,12</sup>

### 2.4.3 Manfaat Enkapsulasi

Enkapsulasi dengan alginat tersebut memberikan beberapa manfaat dalam terapi berbasis sel yaitu melindungi sel punca dari kondisi lingkungan mikro sehingga memungkinkan sel punca memiliki viabilitas yang tinggi, seperti zat yang terkait dengan stres oksidatif dan inflamasi, serta melindungi dari adanya respon imun dari jaringan target. Enkapsulasi ini juga mempertahankan sekresi sitokin dan faktor pertumbuhan pada sel punca.<sup>11</sup>

### 2.4.4 Enkapsulasi Sel Punca Dan Keuntungannya

Ukuran pori kapsul alginat dapat dimanipulasi dengan mengubah komposisi alginat, larutan pembentuk gel dan parameter enkapsulasi lainnya, sehingga kapsul yang dirancang dengan tepat memungkinkan difusi nutrisi dan sinyal parakrin masuk dan keluar dari kapsul, sambil mempertahankan viabilitas dari sel punca.<sup>43</sup>



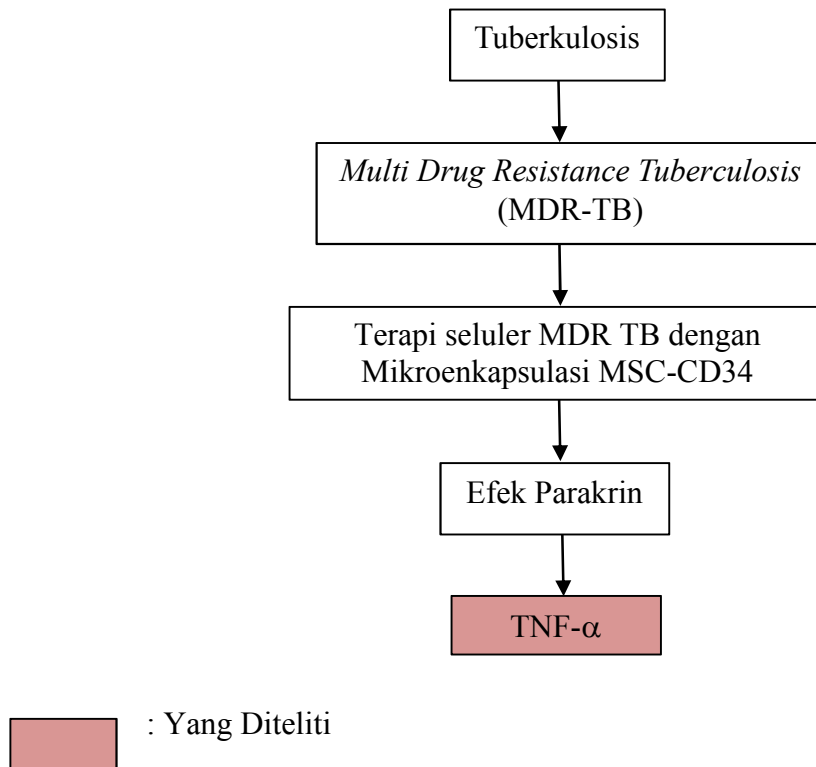
**Gambar 2.7 MSC yang di enkapsulasi**<sup>43</sup>



## 2.5 TNF- $\alpha$

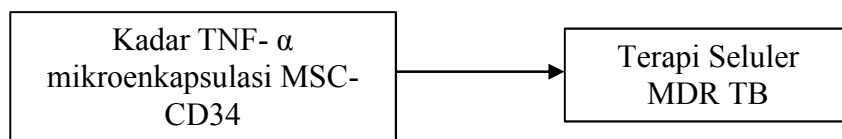
MSC memiliki efek imunomodulator dengan menekan proliferasi dari sel T, inhibisi proliferasi dari sel B, menekan migrasi, maturasi, dan presentasi dari sel dendritik. MSC memiliki efek parakrin, Parakrin yang dihasilkan MSC mengandung *growth factor* dan *chemokine* yang penting dalam *immunomodulator* dan anti inflamasi seperti PGE2, TGF $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , dan IL-10. TNF- $\alpha$  merupakan sitokin yang penting dalam regulasi imunologi dan berperan dalam eliminasi Tuberkulosis. TNF- $\alpha$  diproduksi oleh dendrit, makrofag, dan sel T. Sitokin ini berperan dalam rekrutmen sel fagositosis dengan menstimulasi atau mengaktifkan sel makrofag/dendrit lainnya dan merangsang mengaktifkan sel Th1 melalui IFN.<sup>7</sup> TNF- $\alpha$  tidak hanya sitokin proinflamasi yang kuat tetapi juga memainkan peran penting dalam aktivasi dan migrasi leukosit, respon fase akut, proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis. TNF- $\alpha$  merupakan sitokin immunoregulator.<sup>8</sup> Kadar TNF- $\alpha$  secara sistemik dipengaruhi berbagai faktor, pada saat terjadinya infeksi didapatkan kadar TNF- $\alpha$  meningkat. Kadar TNF- $\alpha$  normal dalam plasma yaitu 4,62 pg/ml. Dimana ketika terjadi proses inflamasi mengakibatkan aktivasi makrofag dan aktivasi ini menyebabkan produksi TNF- $\alpha$  meningkat.<sup>44</sup> Sitokin ini berperan dalam rekrutmen sel fagositosis dengan menstimulasi atau mengaktifkan sel makrofag/dendrit lainnya dan merangsang mengaktifkan sel Th1 melalui IFN. Aktivasi sitokin seperti IFN dan TNF- $\alpha$  mengaktifkan makrofag dan meningkatkan sekresi oksidan seperti oksida nitrat dan superoksida, sehingga membunuh *Mycobacterium Tuberculosis*.<sup>9</sup>

## 2.6 Kerangka Teori



**Gambar 2.8 Kerangka Teori**

## 2.7 Kerangka Konsep



**Gambar 2.9 Kerangka Konsep**

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan studi preliminari eksperimental in vitro dengan tahapan sebagai berikut :

1. Kultur MSC dan sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup>
2. Kapsulasi MSC dan hematopoietik CD34<sup>+</sup>
3. Uji kadar TNF- $\alpha$  dengan pemeriksaan ELISA

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian direncanakan akan dilakukan di SCTE IMERI FK UI (Stem Cell and Tissue Engineering Indonesia Medical Education and Research Institute) pada Agustus s/d Oktober 2023 dengan tahapan sebagai berikut :

1. Tahap I Agustus – September 2023 : Isolasi, kultur dan kapsulasi sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup>
2. Tahap II September - Oktober 2023 : Uji kadar TNF- $\alpha$  pada kultur mikroenkapsulasi hari ke-0, ke-2, ke-7, ke-14 dan ke-21 dengan pemeriksaan ELISA

#### **3.3 Alat dan Bahan**

Alat dan bahan penelitian yang diperlukan selama penelitian dapat dilihat pada tabel

3.1 di bawah ini.

**Tabel 3.1 Alat dan Bahan penelitian**

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
1	<i>Cap</i>	Aseptik	1 boks
2	<i>Freezing container</i>	Cryo	1 boks
3	<i>Hand seal</i>	Aseptik	1 boks
4	Masker	Aseptik	1 boks
5	PBS	washing	1 pack
6	Tip 10 micro	Kapsulasi, ELISA	2 boks
7	Tip 20 micro	Kapsulasi, ELISA	1 boks
8	Tip 100 micro	Kapsulasi, ELISA	1 boks
9	Tip 200 micro	Kapsulasi, ELISA	1 boks
10	Tip 1000 micro	Kapsulasi, ELISA	1 boks
11	Tube 5 mL	Kapsulasi, ELISA	1 boks
12	Tube PCR	Kapsulasi, ELISA	1 boks
13	Mikropipet 10	Kapsulasi, ELISA	1 buah
14	Mikropipet 20	Kapsulasi, ELISA	1 buah
15	Mikropipet 100	Kapsulasi, ELISA	1 buah
16	Mikropipet 1000	Kapsulasi, ELISA	1 buah
17	TNF- $\alpha$ Kit Elisa	ELISA	1 buah

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Isolasi Sel Punca Hematopoietik CD34<sup>+</sup>

Sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> diisolasi dari darah tali pusat bayi baru lahir dengan menggunakan larutan *Ficoll-Hypaque* seperti pada penelitian sebelumnya. Darah tali pusat dan larutan *Ficoll-Hypaque* disentrifugasi hingga memperoleh *buffy coat* dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertahap dengan menggunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*).

Pemisahan sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> dilakukan dengan menggunakan kit isolasi *EasySep* sesuai dengan protokol produsen kit. Suspensi disentrifugasi dan pellet diresuspensi dengan medium kultur RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Penghitungan sel dilakukan dengan menggunakan *tryphan blue* dan kemurnian sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> dianalisa dengan menggunakan flowsitometri.

### 3.4.2 Kultur MSC

Kryopreservasi MSC asal tali pusat dari penelitian sebelumnya *dithawing* dan dikultur dalam *T flask* dengan menggunakan medium kultur MEM (*Minimum Essential Medium*) yang disuplementasi dengan lisat konsentrat trombosit dan heparin. Pemeriksaan flowsitometri CD 105, CD90, dan CD73 dilakukan untuk menganalisa kemurnian MSC berdasarkan kriteria *International Society Cell and Gene Therapy* terhadap CD105, CD90, dan CD73. MSC diinkubasi dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37<sup>0</sup>C, dipanen dengan *Tryple Select* ketika *konfluens* 70 – 80 % dan disubkultur dalam *T flask* dengan densitas 5000 sel/cm<sup>2</sup>. Jumlah sel viabel dihitung dengan *trypan blue exclusion test*.

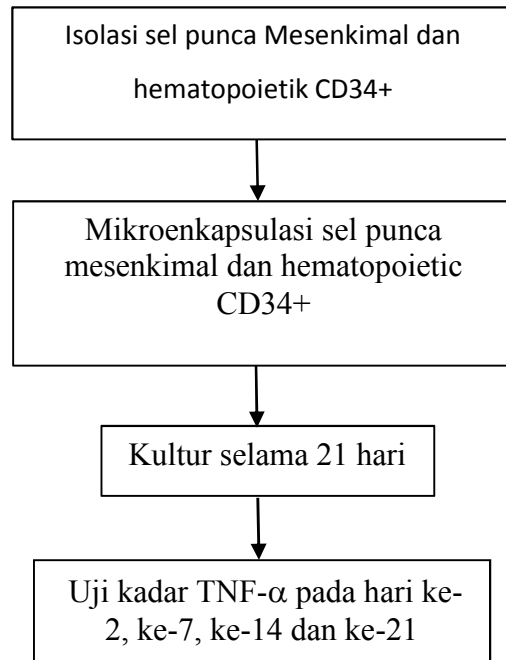
### 3.4.3 Mikroenkapsulasi MSC dan Sel Punca Hematopoietik CD34<sup>+</sup>

Suspensi 1.600.000 MSC dalam 0,4 mL medium kultur MSC dan suspensi 800.000 sel punca hematopoietik dalam 0,2 mL medium kultur CD34<sup>+</sup>, dicampur dalam tube 2 mL. Total larutan sel adalah 0,6 mL dengan jumlah 2.400.000 sel punca. 2,4 mL larutan alginat 1,8% dicampurkan dengan 0.6 mL larutan yang berisi 2.400.000 sel punca. Larutan alginat 1,8% dan suspensi sel ditetaskan ke dalam CaCl 0,2M dengan menggunakan spuit insulin. Untuk kelompok dengan *coating* lisat konsentrat trombosit : 2 ml lisat konsentrat trombosit + heparin 200mikro kapsul disuspensikan ke dalam lisat konsentrat trombosit + heparin dan inkubasi selama 10 menit. Kemudian kapsul dimasukkan ke dalam alginat yang sebelumnya dipakai, inkubasi selama 10 menit. Cuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan dimasukkan ke dalam well yang berisi medium kultur. Untuk kelompok yang tidak *dicoating* dengan lisat konsentrat trombosit langsung cuci dimasukkan ke dalam *well* yang telah berisi medium kultur. Mikroenkapsulasi MSC dan sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> dikultur dalam medium kultur MSC selama 21 hari.

#### 3.4.4 Uji Kadar TNF- $\alpha$

1. Reagen yang akan digunakan dikeluarkan dari freezer dan dibiarkan sampai mencapai suhu ruang, atau reagen yang beku sampai benar-benar cair dan mencapai suhu ruang.
2. Siapkan tube 1.5 mL steril dan beri label S0 (0 pg/mL, hanya pelarut saja) sampai S7 (500 pg/mL).
3. Masukkan larutan Calibrator diluent RD6-12 sebanyak 450  $\mu$ L ke tabung S7, dan 200  $\mu$ L ke tabung S6 - S0. Masukkan standard yang sudah dilarutkan, 50  $\mu$ L ke tabung S7, mix well. Kemudian 200  $\mu$ L dari tube S6 dipipet ke tube S6 dan seterusnya sampai tube S1. S0 adalah zero standard.
4. Siapkan microplate strips standar dan sampel seperti yang telah tertulis di atas (poin 2-4).
5. Tambahkan 50  $\mu$ L Assay diluent RD1F ke masing-masing sumuran. Mix well sebelum digunakan. Pipet sebanyak 50  $\mu$ L standar dan sampel ke masing-masing sumuran.
6. Tutup plate dengan adhesive strips, inkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam pada horizontal orbital microplate shaker (0.12" orbit), 500 rpm.
7. Buang larutan, tepuk-tepuk plate dengan posisi terbalik di atas paper towel. Tambahkan 400  $\mu$ L wash buffer ke masing-masing sumuran menggunakan pipet multichannel. Jika masih terdapat sisa cairan pada sumur, balikkan sumur dan tepuk-tepuk di atas tissue towel atau sisa cairan dapat ditarik menggunakan pipet. Ulangi sebanyak 3x cuci.
8. Tambahkan 200  $\mu$ L Conjugate ke masing-masing sumuran dan tutup dengan adhesive strips yang baru. Inkubasi selama 2 jam dalam suhu ruang pada shaker.
9. Selesai inkubasi, ulangi tahap 7. Buat substrat solution.
10. Tambahkan 200  $\mu$ L Substrat Solution ke masing-masing sumuran dan inkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang. Tutup dan lindungi dari cahaya (simpan di laci).
11. Tambahkan 50  $\mu$ L Stop Solution ke masing-masing sumuran dan baca sampel pada panjang gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan Stop Solution.
12. Baca pada panjang gelombang 450nm. Bila wavelength correction tersedia, atur ke 540 nm atau 570 nm.

### 3.5 Prosedur Penelitian



### 3.6 Defenisi Operasional

**Tabel 3.2 Defenisi Operasional**

Variabel	Defenisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ merupakan sitokin proinflamasi dan immunoregulator yang dapat mengaktifkan makrofag untuk membunuh	Spektrofotometri	ELISA	Kadar TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Ratio

	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>				
--	---------------------------------------	--	--	--	--

### **3.7 Analisis Data**

Analisis data dengan grafik menggunakan excel.