

LEMBANG PENGUSAHAN
LAPORAN HASIL PENELITIAN

Judul : GAMBARAN KADAR TEG-a MIKROINKAPSULASI MSC-CDM
DENGAN COATING: STUDI PRELIMINARI TERAPI SRIJILER
MOR-1B

Nama : Glennsakuara

NPM : 20060015

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II



(Dr. dr. Christeze V. Sibuca, M.Biomed)

Dosen Penguji



(Dr. Johz. C. Silan, M.Ked(Pad),SpSA)

Kerja Program Studi Sarjana Keokteran



(Dr. Diza O. Marpaung, M.Ked(Panc),SpPK-Ork)



(Dr. Adh P. B. Samudra, M.Biomed)

Dejan Fakultas Keokteran
Universitas HKBP Nommensen



(Dr. dr. Leo Simanjuntak, Sp.OG)

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi bakterial yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, dimana merupakan salah satu penyebab utama kematian akibat agen infeksius dan telah menyumbang lebih dari 1 juta kematian setiap tahunnya.¹ Sekitar 10.000 juta orang di seluruh dunia terjangkit tuberkulosis setiap tahunnya. Cara penularan antar manusia melalui kontak pernapasan dan paling sering menyerang paru-paru, tetapi dapat menyebar ke jaringan manapun. Tuberkulosis dapat disembuhkan dengan pemberian Obat Anti Tuberkulosis (OAT) selama 6 bulan. Penggunaan OAT yang salah atau tidak tepat menjadi penyebab munculnya *strain* TB resisten obat, sehingga dapat mengakibatkan terjadinya *Multidrug-resistant Tuberculosis* (MDR-TB).²

Kasus MDR-TB yang menunjukkan resistensi terhadap pengobatan isoniazid dan rifampisin, diestimasi 437.000 insidensi pada tahun 2020 dan 450.000 insidensi pada tahun 2021 secara global.³ Hal ini menunjukkan adanya peningkatan jumlah kasus insidensi antara 2020 dan 2021. Peningkatan jumlah tersebut terjadi akibat dampak pandemi *Corona Virus Disease 2019* (COVID-19).⁴ Indonesia menjadi salah satu dari 20 negara utama dengan kasus MDR-TB tertinggi di dunia. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan pada tahun 2018, kasus MDR-TB di Indonesia sekitar 24.000 kasus per tahun.⁵

Penatalaksanaan tuberkulosis tipe resisten obat lebih sulit dibandingkan penanganan tuberkulosis yang rentan terhadap obat. Pengobatan MDR-TB membutuhkan jangka waktu yang lama dengan OAT lini kedua yang kurang efektif dan toksik serta memiliki hasil yang kurang baik.⁶ Kegagalan pengobatan dan mortalitas MDR-TB tinggi. Data WHO pada tahun 2018 menunjukkan bahwa dari 32% kasus yang menjalani terapi, tingkat keberhasilan pengobatan hanya 56%.⁵ Sebuah laporan dari Iran, menemukan efek samping utama dari pengobatan MDR-TB adalah gangguan neurologis, toksisitas pendengaran, hepatitis, ruam, dan toksisitas ginjal.² Adanya peningkatan kasus MDR-TB, rendahnya angka kegagalan

pengobatan dan tingginya mortalitas penderita MDR-TB menimbulkan kebutuhan akan adanya terapi alternatif untuk menangani MDR-TB. Terapi seluler telah dikembangkan dalam pengobatan penyakit degeneratif dan penyakit infeksi pada beberapa dekade terakhir ini. Terapi seluler menggunakan sel punca telah banyak dikembangkan dalam penelitian pengobatan TB dan MDR-TB sebelumnya.

Mesenchymal Stem Cell (MSC) digunakan dalam terapi seluler untuk penyakit autoimun dan infeksi karena efek imunomodulatornya yang kuat dan kemampuan regenerasi jaringan. MSC memiliki efek parakrin yang mensekresi sitokin, salah satunya adalah *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α).⁷ TNF- α berperan penting dalam regulasi respon imun dan respon inflamasi, proliferasi, regulasi apoptosis sel, dan nekrosis yang terprogram.^{8,9} Penelitian yang dilakukan oleh Clement, *et al.*, 2019, menunjukkan kadar serum TNF- α tinggi pada pasien TB. Pada awal infeksi TB, sitokin TNF- α penting dalam perlindungan terhadap TB dimana TNF- α meningkatkan kemampuan makrofag untuk merangsang apoptosis dan memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁰ Menurut penelitian Devi, *et al.*, 2023, MSC menghambat respon T sel dan membatasi pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*, sehingga menunjukkan adanya peluang penggunaan terapi seluler MSC sebagai alternatif baru dalam pengobatan MDR-TB.¹¹ CD34⁺ yang berasal dari darah tali pusat memiliki kemampuan angiogenesis, potensi imunomodulator yang kuat dan mendukung plastisitas MSC.^{9,12} *Platelet-rich plasma* (PRP) merupakan plasma darah yang dikonsentrasikan dan mengandung faktor pertumbuhan serta substansi aktif lainnya seperti sitokin dan *growth factors*. PRP juga kaya akan fibrin, fibronectin, dan vitronektin.¹³ PRP akan membantu MSC dalam beradaptasi di lingkungan yang ditempatinya.¹⁴

Terapi seluler yang menggunakan *stem cell* memiliki kelemahan dalam mempertahankan viabilitas sel punca dimana kematian *stem cell* terjadi sebelum migrasi maksimal dan *homing* target organ. Sebelumnya, juga telah dibuktikan pada penelitian Khatab, *et al.*, 2020, bahwa *stem cell* tidak lagi terdeteksi 3 minggu setelah diinjeksikan.¹⁵ Enkapsulasi *stem cell* dapat mempertahankan viabilitas *stem cell*, dengan cara melindungi *stem cell* dari stres oksidatif, inflamasi, dan respon imun inang.¹⁶ Enkapsulasi dilakukan dengan menggunakan bahan polimer sintetik

dan alginat merupakan salah satu jenis bahan yang sering digunakan. Alginat merupakan polisakarida anionik tidak bercabang yang terbentuk secara alami, di ekstrak dari *algae* cokelat (*Phaeophyta*), tetapi juga dapat disintesis dari bakteri.^{13,17} Matriks enkapsulasi dapat dengan aman melindungi MSC dan mempertahankan kelangsungan hidup serta fungsinya secara *in vitro* dan *in vivo* yang pada akhirnya memiliki potensi terapeutik.

Penelitian ini menggunakan MSC dan CD34⁺ yang dienkapsulasi dengan bahan dasar alginat mikrogel dan disalut dengan PRP untuk mempertahankan viabilitas dari MSC dan juga meningkatkan efektivitas terapi dari MSC. Enkapsulasi MSC dan CD34⁺ dan penyalutan dengan PRP dapat meningkatkan viabilitas MSC dan CD34⁺ dan mendukung fungsi *stem cell* dalam efek parakrin TNF- α untuk eliminasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil penelitian ini diharapkan akan menjadi dasar dalam penelitian lanjutan tentang penggunaan MSC dan CD34⁺ sebagai terapi seluler MDR-TB. Oleh karena itu, penulis ingin mengetahui gambaran dari kadar TNF- α yang terlihat pada mikroenkapsulasi MSC dan CD34⁺ yang disalut dengan PRP sebagai studi preliminari terapi seluler MDR-TB.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana gambaran kadar dari TNF- α pada mikroenkapsulasi MSC dan CD34 yang disalut dengan PRP ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui gambaran kadar TNF- α pada mikroenkapsulasi MSC dan CD34 yang disalut dengan PRP studi preliminari terapi seluler MDR-TB.

1.3.2. Tujuan Khusus

Untuk melihat kadar TNF- α yang dihasilkan pada mikroenkapsulasi MSC dan CD34 yang disalut dengan PRP studi preliminari terapi seluler MDR-TB.

1.4. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini antara lain:

1.4.1. Bagi masyarakat :

Manfaat dari penelitian ini untuk masyarakat sebagai informasi untuk pengobatan alternatif MDR-TB.

1.4.2. Bagi institusi :

Manfaat dari penelitian ini untuk institusi sebagai pengetahuan tambahan tentang pengobatan MDR-TB.

1.4.3. Bagi peneliti :

Manfaat dari penelitian ini untuk peneliti sebagai pembelajaran preliminari penggunaan mikroenkapsulasi MSC dan CD34 yang disalut dengan PRP sebagai terapi seluler MDR-TB.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular dan infeksius yang disebabkan oleh kelompok bakteri *Mycobacterium*, yaitu bakteri jenis *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁸ *Mycobacterium tuberculosis* penyebab TB adalah basil yang tahan terhadap alkohol dan asam.¹⁹ Infeksi TB menyerang paru-paru (86%) dan juga dapat menyerang bagian tubuh lain kecuali kuku dan rambut yang dikenal dengan TB ekstrapulmonal. Pada TB pulmonal, *Mycobacterium tuberculosis* dapat menyebar secara *airborne* melalui tindakan batuk, bersin, dan berbicara.²⁰

Pasien dengan TB yang sedang aktif, umumnya memiliki gejala seperti batuk, hemoptisis, demam, berat badan menurun, dan keringat di malam hari.¹⁹ Diagnosa TB ditegakkan melalui gejala klinis pasien, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan penunjang. Pada pemeriksaan fisik pasien TB umumnya ditemukan suara napas bronkial, napas melemah, ronki basah di daerah lobus superior.²¹ Diagnosa untuk sebagian besar pasien di seluruh dunia yang dicurigai menderita TB dilakukan pengumpulan dahak Sewaktu-Pagi-Sewaktu (SPS) dengan mikroskop apusan dahak untuk melihat basil tahan asam.²² Pemeriksaan penunjang berupa radiologi untuk melihat letak lesi TB, yang umumnya bayangan infiltrat berada di daerah apex paru. Namun, tidak menutup kemungkinan mengenai lobus bagian bawah atau daerah hilus yang mirip dengan tumor paru.²¹ WHO merekomendasi penggunaan tes biomolekular yaitu *Xpert MTB/RIF* dan *XPRT MTB RIF Ultra assays* sebagai tes diagnostik untuk pasien yang di curigai TB, dengan cara *Nucleic Acid Amplification Test* (NAAT) dalam mendeteksi DNA TB.²³

Pengobatan standar TB paru diawali dengan 2 bulan empat kali terapi dengan isoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (EMB), dan pirazinamid (PZA) yang langsung di lanjutkan dengan terapi 4 bulan pemberian RIF dan INH selama 4 bulan. Penggunaan obat TB dilakukan minimal 6 bulan dengan beberapa kombinasi obat. Penggunaan obat dalam jangka panjang dan kombinasi dapat menimbulkan

berbagai efek samping obat dan resisten terhadap obat. Efek samping yang ditimbulkan oleh obat anti-TB cukup beragam, seperti mual, muntah, kaki kesemutan, dan kadang disertai urin berwarna merah.¹⁸

2.2. Multidrug-resistant Tuberculosis (MDR-TB)

Multidrug-resistant Tuberculosis (MDR-TB) didefinisikan sebagai tuberkulosis yang disebabkan oleh strain *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap isoniazid (INH) dan rifampisin (RIF), yang merupakan dua obat lini pertama yang digunakan dalam pengobatan TB.²⁴

MDR-TB sering dicurigai ketika hasil pemeriksaan bakteri tahan asam (BTA) atau kultur seorang pasien tetap positif setelah pengobatan dilakukan. MDR-TB juga dicurigai ketika seorang telah terpapar dengan pasien MDR-TB atau XDR. Pedoman WHO pada tahun 2020 merekomendasikan penggunaan uji molekuler gen sebagai tes awal untuk diagnosis TB paru dan ekstra paru serta resistensi rifampisin pada orang dewasa dan anak-anak.²⁵

Pengobatan MDR-TB bertujuan untuk menyembuhkan pasien dan menghindari penularan MDR-TB ke orang lain. Pengobatan MDR-TB membutuhkan masa pengobatan selama 15-21 bulan, dengan obat oral kombinasi. Obat lini pertama MDR-TB terdiri dari levofloxacin dengan bedaquiline, linezolid, clofazimine, dan cycloserine. Obat lini kedua adalah delamanid atau pyrazinamide atau ethambutol atau streptomycin atau amikacin. Obat lini ketiga antara lain ethambutol atau prothionamide atau clavulanate atau asam aminosalicilic atau isoniazid dengan dosis tinggi.²³

MDR-TB memiliki tingkat kegagalan pengobatan dan mortalitas yang tinggi. Pada tahun 2018, data yang didapat dari WHO menyatakan bahwa dari seluruh penderita MDR-TB di dunia, hanya 32% kasus yang menjalani terapi, dengan tingkat keberhasilan 56%.²⁶

2.3. MSC (*Mesenchymal Stem Cell*)

Mesenchymal Stem Cell (MSC) merupakan sel punca multipoten yang memiliki kemampuan proliferasi, diferensiasi dan plastisitas yang tinggi. MSC

dapat diambil dari berbagai jaringan, yaitu dari sum-sum tulang *bone marrow* MSC (BM-MS), dari jaringan adiposa *adipose tissue* (AD-MS) dan jaringan umbilikal *umbilical cord* (UC-MS). BM-MS telah banyak digunakan sebagai sumber utama dari MS di praktek klinis, sedangkan AD-MS dan UC-MS baru muncul sebagai sumber baru dengan sifat regeneratif dan immunomodulator yang terdokumentasi dengan baik. AD-MS dapat dengan mudah diperoleh dalam jumlah yang tinggi dari jaringan adiposa ketika prosedur *liposuction/lipoplasty*. UC-MS diambil dari tali pusat yang dianggap sebagai limbah medis pada saat kelahiran.²⁷

MS secara aktif mensekresi kandungan immunomodulatornya melalui mekanisme parakrin. Efek parakrin MS mengandung beragam *growth factor*, sitokin, dan kemokin seperti *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β), *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-8 (IL-8), Prostaglandin E2 (PGE2), Interferon Gamma (IFN- γ), *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1), Nitrogen Oksida dan lainnya yang bermanfaat bagi dirinya sendiri (fungsi autokrin) atau sel tetangga (fungsi parakrin) untuk memodulasi sistem imun tubuh, respon inflamasi, serta menstimulasi neoangiogenesis. Sitokin yang dieksresikan MS terlibat dalam perbaikan dan regenerasi jaringan misalnya sistem saraf pusat, jantung, tulang, dan jaringan rusak lainnya.^{27,28,29}

2.4. CD34⁺

CD34⁺ adalah antigen *transmembrane phosphoglycoprotein* yang diidentifikasi pertama kali pada tahun 1984.³⁰ Darah tali pusat mengandung variasi populasi sel punca dan sel progenitor yang meliputi *Hematopoietic Stem Cell* (HSC), sel progenitor endothelial dan MS. Sel progenitor HSC diidentifikasi oleh ekspresi permukaan molekul CD34⁺ yang efek parakrinnya sangat penting dalam pemeliharaan sum-sum tulang dan sistem darah.³¹

Sel darah CD34⁺ memediasi respon angiogenik, kemampuan meningkatkan regenerasi jaringan, dan sekresi faktor anti-inflamasi melalui aktivitas parakrin. Terapi sel CD34⁺ secara signifikan menurunkan regulasi dari faktor pro-inflamasi

(IL-1 β , IL-6, dan TNF- α) dan meningkatkan ekspresi regulasi dari molekul anti-inflamasi yaitu IL-10. Efek parakrin dari sel CD34⁺ juga telah terbukti meningkatkan pembentukan mikrosirkulasi epikardial dan koroner melalui respon angiogenik dan sekresi faktor anti-inflamasi.^{32,33}

2.5. Enkapsulasi Sel Punca

Enkapsulasi sel merupakan bioteknologi yang menjaga sel terisolasi dari respon imun inang. Lapisan enkapsulasi berasal dari bahan polimer yang membentuk membran semipermeabel sehingga masih memungkinkan difusi dari gas, nutrisi, dan terapeutik, kecuali sel imun inang.³⁴ Bahan yang ideal untuk enkapsulasi membutuhkan viabilitas, stabilisasi, non reaktivitas dengan bahan inti, kelarutan dalam pelarut tidak beracun, non-higroskopisitas, dan paling penting dapat melepaskan bahan inti ke target dalam kondisi tertentu.³⁵

Enkapsulasi menggunakan bahan polimer, terbagi menjadi 3 kategori antara lain natural, sintetik, dan semi sintetik. Polimer natural (biopolimer) disintesis dari tanaman, hewan dan mikroorganisme yang bahan utamanya terdiri dari protein, lemak, dan polisakarida. Polimer sintetik merupakan molekul yang disintesis di laboratorium, antara lain *polyamide*, polietilen glikol, *polyvinil aasetat* (PVAc), dan polietilena. Semi-sintetik polimer merupakan kombinasi dari sintetik dan substansi alami.³⁵

Polimer yang paling sering digunakan dalam kapsulasi adalah alginat. Alginat merupakan polimer alami yang diekstraksi terutama dari *brown marine algae*, dan telah *Generally Recognized As Safe* (GRAS), tidak beracun, non-antigenik, *biocompatible*, dan *biodegradable*. Enkapsulasi dengan alginat terbukti dapat memberikan lingkungan yang memadai untuk kelangsungan hidup berbagai jenis sel dan melindungi sel yang diimplan ke dalam tubuh dari sistem imun tubuh, tanpa mengganggu difusi nutrisi dan sinyal parakrin ke dalam maupun luar kapsul.³⁵

Penggunaan metode enkapsulasi sel memungkinkan imunoisolasi sel yang diimplantasi, yang akan meningkatkan daya tahan hidup panjang *in vivo*, juga membuka jalan baru untuk pengiriman sel yang ditargetkan.³⁷ Metode enkapsulasi menggunakan membran semipermeabel sehingga pertukaran difusi pasif glukosa,

insulin, oksigen, karbon dioksida, dan nutrisi lain dapat terjadi, sekaligus mencegah kontak langsung antar sel dengan sel imun inang.³⁸

Keuntungan dalam teknologi enkapsulasi MSC memberikan dampak baik dalam viabilitas, proliferasi, kemampuan diferensiasi, dan perlindungan MSC terhadap sel imun dalam tubuh. Enkapsulasi MSC memberikan tiruan 3D lingkungan *in vivo*, sehingga dapat mempertahankan kelangsungan hidup sel dan menginduksi diferensiasi sel punca menjadi multi lini. Matriks 3D yang mengelilingi MSC melindunginya dari sistem kekebalan tubuh inang dan juga memungkinkan difusi biomolekul seperti oksigen, sitokin, dan faktor pertumbuhan.²⁸

2.6. PRP

Sejak tahun 1990, *Platelet-rich plasma* (PRP) telah digunakan dalam beberapa bidang pengobatan regeneratif. PRP diambil dari darah pasien melalui proses sentrifugasi yang membentuk fraksi plasma dengan konsentrasi trombosit yang lebih tinggi daripada sirkulasi darah. Efek terapeutik PRP berasal dari pelepasan *growth factor* yang berasal dari granula alfa platelet pada saat aktivasi.^{14,39}

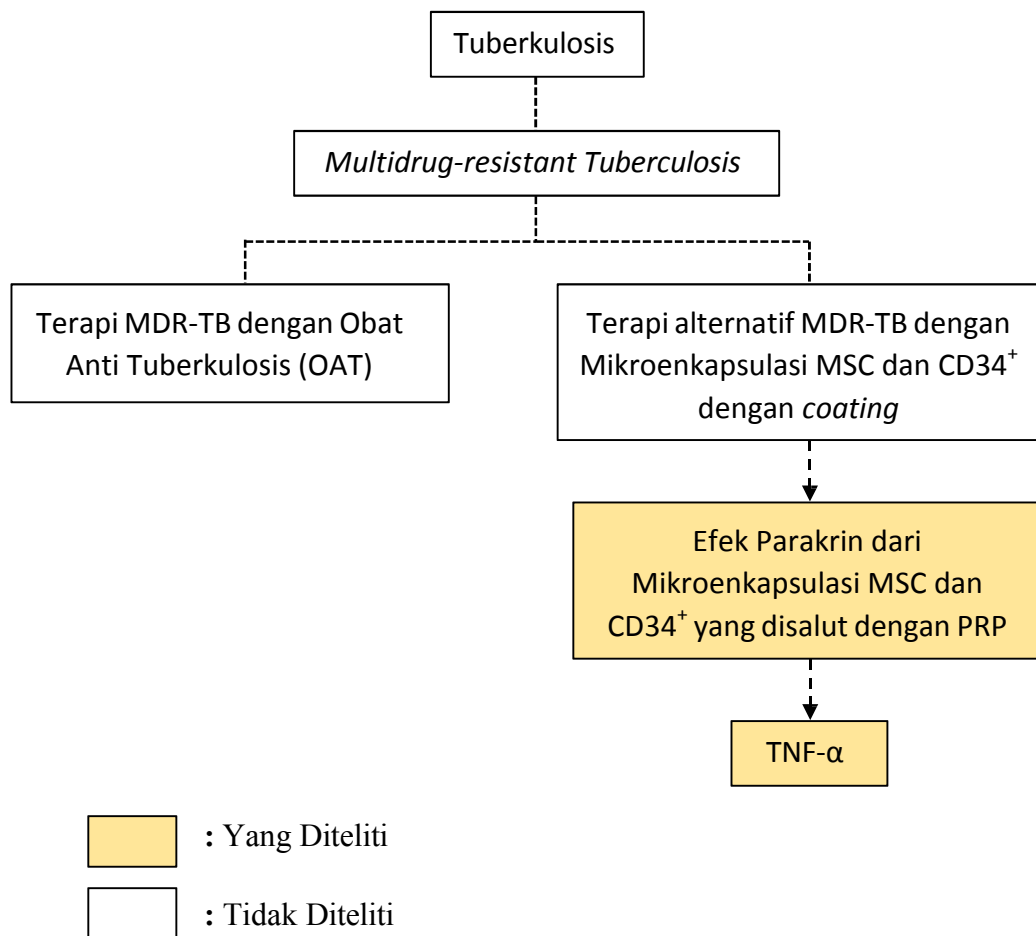
PRP dapat digunakan sebagai bahan tambahan dalam peningkatan efektivitas terapeutik MSC untuk meningkatkan pro-angiogenik, kelangsungan hidup, dan potensi proliferasi dari MSC. Efek pro-stimulasi PRP pada MSC juga membantu dalam adaptasi MSC yang diimplantasi ke lingkungan setempat.¹⁴

2.7. Tumor Necrosis Factor Alpha

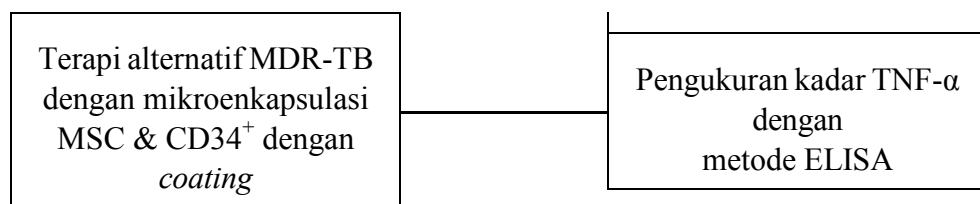
Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) secara alami diproduksi oleh makrofag dan monosit yang memiliki efek pleiotropik pada sel normal dan ganas. TNF- α memiliki peran penting dalam berbagai proses biologis, seperti imunomodulasi, demam, respon inflamasi, penghambatan pembentukan tumor, dan penghambatan replikasi virus. TNF- α juga terlibat dalam mengatur proliferasi, apoptosis, dan diferensiasi sel progenitor. TNF- α cenderung mengarah ke proliferasi dan menghambat diferensiasi progenitor dengan mengaktifkan pensinyalan NF- κ B, sedangkan yang berkaitan dengan sel induk dan sel yang

berdiferensiasi, TNF- α cenderung menginduksi apoptosis.⁴⁰ TNF- α meningkatkan kemampuan makrofag untuk memfagositosis dan membunuh *mycobacterium* serta menstimulasi apoptosis makrofag, juga berperan dalam imunopatologi dari TB, melalui proses induksi dari sitokin lain (IL-1 dan IL-6), kemokin, dan supraregulasi dari molekul adhesi.⁴¹

2.8. Kerangka Teori



2.9. Kerangka Konsep



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan eksperimental *preliminary study in vitro* dengan tahap-tahap sebagai berikut:

1. Kultur MSC dan CD34⁺
2. Enkapsulasi sel MSC dan CD34⁺
3. Salut MSC dan CD34⁺ dengan PRP
4. Uji kadar TNF- α dengan pemeriksaan ELISA

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus - Oktober 2023 yang berlokasi di SCTE IMERI FK UI, dengan tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Tahap I Agustus - September 2023: Isolasi, kultur, kapsulasi dan salut MSC dan CD34⁺ dengan PRP.
2. Tahap II September - Oktober 2023: Uji kadar TNF- α pada kultur mikroenkapsulasi dan salut PRP pada hari ke-2, ke-7, ke-14, dan ke-21 dengan pemeriksaan ELISA.

3.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa MSC dan HSC CD34⁺ dengan metode *duplo* yang berdasarkan kelompok pengamatan pemeriksaan, dikelompokkan menjadi 4. Total sampel penelitian adalah 8.

3.4. Alat dan Bahan

Alat dan bahan penelitian yang dibutuhkan selama penelitian dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 3.1 Alat dan Bahan Penelitian

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
1	Cap	Aseptik	1 boks
2	Freezing container	Cryo	1 boks
3	Hand seal	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- α Kit Elisa	ELISA	1 buah

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Isolasi Sel Punca Hematopoietik CD34⁺

CD34⁺ diambil dari darah tali pusat bayi yang 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. Pemisahan CD34⁺ dilakukan dengan menggunakan kit isolasi *EasySep* sesuai dengan protokol produsen kit. Suspensi disentrifugasi dan pellet diresuspensi dengan medium kultur RPMI. Penghitungan sel dilakukan dengan menggunakan *tryphan blue* dan kemurnian CD34⁺ dianalisa dengan menggunakan flowsitometri.

3.5.2. Kultur MSC

Kriopreservasi MSC asal tali pusat dari penelitian sebelumnya di *thawing* dan dikultur dalam T *flask* dengan menggunakan medium kultur MEM yang disuplementasi dengan lisat konsentrat trombosit dan heparin. Pemeriksaan flowsitometri CD105, CD90, dan CD73 dilakukan untuk menganalisa kemurnian MSC berdasarkan kriteria *International Society Cell and Gene Therapy* terhadap CD105, CD90, dan CD73. Sel punca mesenkimal diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ pada suhu 37⁰C, dipanen dengan *Tryple Select* ketika konfluens 70 – 80 % dan disubkultur dalam T *flask* dengan densitas 5000 sel/cm². Jumlah sel viabel dihitung dengan *trypan blue exclusion test*.

3.5.3. Mikroenkapsulasi MSC dan CD34⁺

Suspensi 1.600.000 MSC dalam 0,4 mL medium kultur MSC dan suspensi 800.000 HSC dalam 0,2mL medium kultur CD34⁺, dicampur dalam tube 2mL. Total larutan sel adalah 0,6mL dengan jumlah 2.400.000 sel punca. 2,4mL larutan larutan alginat 1,8% dicampurkan dengan 0,6mL larutan yang berisi 2.400.000 sel punca. Larutan alginat 1,8% dan suspensi sel diteteskan ke dalam CaCl 0,2M dengan menggunakan spuit insulin.

Lisat konsentrat trombosit sebanyak 2ml dan lisat konsentrat trombosit + heparin sebanyak 200 mikro 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. Mikroenkapsulasi MSC dan CD34⁺ yang disalut dengan PRP dikultur dalam medium kultur MSC selama 21 hari.

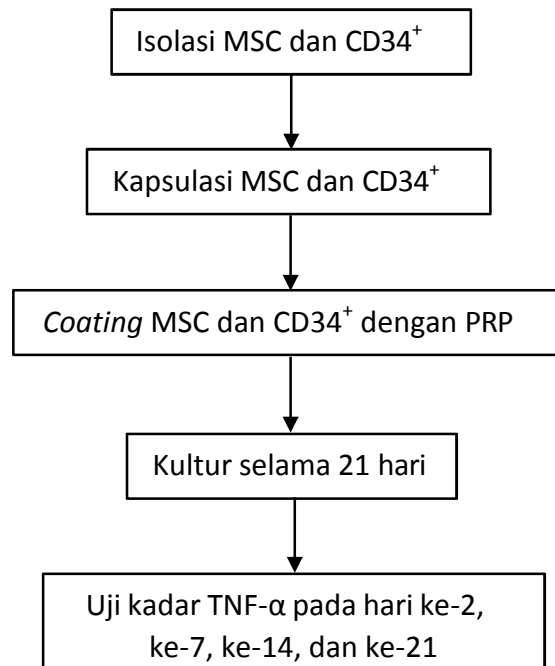
3.5.4. Uji Kadar TNF- α

Kadar TNF- α diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada medium kultur mikroenkapsulasi. Analisa dilakukan pada hari ke-2, hari ke-7, hari ke-14 dan, hari ke-21. Kit untuk mengukur kadar TNF- α menggunakan *Human TNF- α ELISA Kit* sesuai dengan petunjuk dari produsen.

1. Siapkan tube 1.5mL steril dan beri label S0 (0pg/mL, hanya pelarut saja) sampai S7 (500pg/mL).

2. Masukkan larutan Calibrator *diluent* RD6-12 sebanyak 450 μ L ke tabung S7, dan 200 μ L ke tabung S6 - S0. Masukkan *standard* yang sudah dilarutkan, 50 μ L ke tabung S7, *mix well*. Kemudian 200 μ L dari tube S6 dipipet ke tube S6 dan seterusnya sampai tube S1. S0 adalah *zero standard*.
3. Siapkan *microplate strips* standar dan sampel.
4. Tambahkan 50 μ L *Assay diluent* RD1F ke masing-masing sumuran. *Mix well* sebelum digunakan. Pipet sebanyak 50 μ L standar dan sampel ke masing-masing *well*.
5. Tutup *plate* dengan *adhesive strips*, inkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam pada horizontal orbital *microplate shaker* (0.12" orbit), 500rpm.
6. Buang larutan, tepuk-tepuk plate dengan posisi terbalik di atas *paper towel*. Tambahkan 400 μ 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.
7. Tambahkan 200 μ L *conjugate* ke masing-masing sumuran dan tutup dengan *adhesive strips* yang baru. Inkubasi selama 2 jam dalam suhu ruang pada *shaker*.
8. Selesai inkubasi, ulangi tahap 7. Buat *substrat solution*.
9. Tambahkan 200 μ L *substrat solution* ke masing-masing sumuran dan inkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang. Tutup dan lindungi dari cahaya (simpan di laci).
10. Tambahkan 50 μ L *stop solution* ke masing-masing sumuran dan baca sampel dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan *stop solution*.
11. Baca pada panjang gelombang 450nm. Bila *wavelength correction* tersedia, atur ke 540nm atau 570nm.

3.6. Alur Penelitian



3.7. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
TNF- α	Sitokin pro-inflamasi, molekul protein kecil yang di produksi oleh makrofag sebagai respon infeksi bakteri atau sumber imun lainnya.	Spektrofotometer	ELISA	Kadar TNF- α	Rasio

3.8. Analisa Data

Analisa data dari penelitian ini menggunakan software *Microsoft Excel*.

3.9. Rencana Biaya Penelitian

No	Uraian	Biaya
1.	TNF- α Elisa <i>Kit</i> dan Reagensia	Rp. 10.000.000,-
2.	Analisis	Rp. 1.000.000,-
	Total Biaya	Rp. 11.000.000,-

3.10. Sumber Dana Penelitian

Dana penelitian menggunakan hibah penelitian internal Universitas HKBP Nommensen.

