

**LEMBAR PENGESAHAN  
LAPORAN HASIL PENELITIAN**

**Judul : Perbedaan Kadar I<sup>H</sup>N- $\gamma$  Mikroenkapsulasi Sel Puncu Plekromokoral  
Coating dan Non Coating : Studi Preliminari Terapi Seluler MDR-TB**

**Nama : Maria Mannella Sibarani**

**NPM : 20000130**

---

**Dosen Pembimbing I**



dr. Ervina Julien Siranggang, M.Diomed

**Dosen Pembimbing II**



dr. Dina O. Marprung, M.Ked(Paru), Sp.P(K)-Onk

**Dosen Penguji**



Dr. dr. Jerry Ria Sihombing, Sp.PK

**Ketua PSSK**



dr. Ade Pryta R. Simaremare, M.Biomed

**Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas HKBP Nommensen**



Dr. dr. Leo Simanjuntak, Sp. OG

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) yang resistan terhadap setidaknya dua jenis Obat antituberkulosis (OAT) lini pertama seperti rifampisin dan isoniazid.<sup>1</sup> Penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan global. Estimasi jumlah penderita MDR-TB tahun 2021 secara global sebanyak 450.000 kasus, dimana 191.000 diantaranya mengalami kematian.<sup>2</sup> Menurut data World Health Organization (WHO) pada tahun 2021 Indonesia masuk ke dalam peringkat ke-3 Asia dengan jumlah kasus MDR-TB yaitu sebanyak 28.000 kasus, yang merupakan terbanyak setelah China, dan India.<sup>3</sup>

Saat ini pengobatan MDR-TB dilakukan selama 9 - 20 bulan.<sup>4</sup> Pengobatan MDR-TB saat ini masih bergantung pada kombinasi antibiotik sebagai fokus utama penyembuhan bakteriologis. Menurut penelitian oleh Tae won dkk., Efek samping terkait pengobatan MDR-TB yang diamati pada 95 dari 256 pasien yaitu berupa ototoksisitas, nefrotoksisitas, hipotiroidisme, hepatotoksisitas, gangguan kejiwaan, serangan epilepsi, dan gangguan saluran cerna.<sup>5</sup>

Akibat dari efek samping dari terapi yang tidak memuaskan, maka sangat penting untuk menemukan terapi baru sebagai upaya meningkatkan hasil pengobatan. Berbagai penelitian mulai dikembangkan untuk mengatasi keterbatasan ini, Salah satu pengobatan yang memungkinkan adalah dengan sel punca mesenkimal (*Mesenchymal stem cells*). Fungsi imunomodulatornya, serta kemampuannya untuk mengganti atau memperbaiki jaringan yang rusak merupakan alternatif pengobatan yang ideal untuk penyakit kronis.<sup>6</sup>

Sel punca mesenkimal merupakan sel yang mampu melakukan pembaharuan diri dan berdiferensiasi menjadi bentuk sel lain yang lebih spesifik dan fungsional.<sup>7</sup> Sel punca mesenkimal dapat diperoleh serta dikembangkan dari beberapa jaringan seperti sumsum tulang, jaringan plasenta, jaringan lemak, dan jaringan kulit. Secara khusus sel punca mesenkimal banyak terdapat pada plasenta, tali pusat, membran amnion, dan cairan amnion yang sering kali dianggap sebagai

limbah medis. Pada tali pusat terdapat dua arteri dan vena yang ada di dalam jaringan ikat mukosa yang dikenal sebagai *Wharton jelly*.<sup>8</sup> Menurut sebuah studi oleh Khan dkk., sel punca mesenkimal dapat bertindak sebagai sel fagositik yang dapat berpotensi untuk mengobati MDR-TB.<sup>9</sup>

Respon imun terhadap infeksi M.tb berkaitan dengan peran IFN- $\gamma$  dalam aktivasi sistem kekebalan tubuh pada TB. IFN- $\gamma$  merupakan glikoprotein yang dihasilkan oleh sel T yang dapat meningkatkan respon imun seluler untuk mengaktifkan makrofag sebagai penghancur mikroba dalam proses fagosom. Hal ini dibuktikan oleh penelitian Basingnaa dkk., bahwa kadar plasma IFN- $\gamma$  jauh lebih tinggi pada MDR-TB, hal ini diakibatkan karena pentingnya peran IFN- $\gamma$  untuk menghancurkan mikobakteri akibat resistansi.<sup>10</sup>

Mempertahankan sel punca mesenkimal baik secara *in vitro* maupun *in vivo* perlu ditingkatkan.<sup>11</sup> Hal ini diakibatkan karena sel punca mesenkimal dapat begitu cepat kehilangan fungsi saat tubuh memberikan sinyal sistem kekebalan tubuh kepada sel untuk melakukan fagositosis. Dalam penelitian sibuea dkk., sel punca asal tali pusat yang telah diko-kultur dapat bertahan hingga hari ke-14.<sup>12</sup> Faktor yang mempengaruhi kondisi optimum sel kultur adalah kondisi fisiologis kultur dan lingkungan mikroseluler kultur yang menyerupai keadaan jaringan *in vivo*.<sup>13</sup>

Mikrokapsul menyediakan lingkungan yang cocok untuk kelangsungan hidup berbagai jenis sel dan teknik enkapsulasi pada sel punca mesenkimal akan mencegah sel secara langsung masuk ke pembuluh darah, dengan tujuan untuk menilai sejauh mana sel yang dienkapsulasi mempertahankan karakteristik sel punca mesenkimal setelah implantasi *in vivo*.<sup>14</sup>

Pemberian *coating* digunakan untuk melapisi permukaan kultur sebagai upaya meningkatkan perlekatan dan viabilitas pertumbuhan sel punca mesenkimal. *Coating* dapat disesuaikan dengan jenis sel apapun untuk terapi sel dan regenerasi jaringan, yang nantinya akan berdampak pada proses transplantasi, dan penargetan sel.<sup>15</sup> Berdasarkan uraian pendahuluan diatas, dan macam perbedaan pengkodinsian kultur, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan kadar IFN- $\gamma$  pada

medium kultur antara mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coating* dan *non coating* sebagai studi preliminari terapi seluler MDR-TB.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan permasalahan di atas, maka yang menjadi pertanyaan dalam penelitian adalah apakah terdapat perbedaan kadar IFN- $\gamma$  pada medium kultur antara mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coating* dan *non coating* ?

## **1.3 Hipotesis**

Adanya perbedaan kadar IFN- $\gamma$  pada medium kultur antara mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coating* dan *non coating*.

## **1.4 Tujuan Penelitian**

### **1.4.1 Tujuan Umum**

Adapun tujuan umum untuk penelitian ini adalah :  
Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar IFN- $\gamma$  pada medium kultur antara mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coating* dan *non coating*.

### **1.4.2 Tujuan khusus**

Adapun tujuan khusus untuk penelitian ini adalah :

- a. Untuk mengetahui kadar IFN- $\gamma$  pada medium kultur mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *non coating*
- b. Untuk mengetahui kadar IFN- $\gamma$  pada medium kultur mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal dengan *coating*

## **1.5 Manfaat Penelitian**

### **1.5.1 Bagi Peneliti**

Memberikan pengetahuan mengenai kadar IFN- $\gamma$  yang disekresi oleh sel punca mesenkimal pada kultur mikroenkapsulasi *coating* dan *non coating* sehingga dapat dijadikan landasan ilmiah dalam pengembangan pengobatan MDR-TB dengan sel punca mesenkimal dengan teknologi mikroenkapsulasi.

### **1.5.2 Bagi Institusi**

Memberikan pengetahuan mengenai studi pendahuluan dan landasan ilmiah untuk riset penggunaan sel punca mesenkimal dalam pengembangan pengobatan MDR-TB.

### **1.5.3 Bagi Masyarakat**

Menambah pengetahuan mengenai terapi alternatif MDR-TB berbasis mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coating* dan *non coating*.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Multidrug resistant tuberculosis

##### 2.1.1 Definisi

*Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) yang resistan terhadap setidaknya dua jenis Obat antituberkulosis (OAT) lini pertama seperti rifampisin dan isoniazid.<sup>1</sup> Kategori resistansi OAT terhadap infeksi M.tb, yaitu:<sup>16</sup>

- a. *Monoresistance* : resistan terhadap salah satu OAT, misalnya resistan isoniazid (H).
- b. *Polyresistance* : resistan terhadap lebih dari satu OAT, selain kombinasi isoniazid (H) dan rifampisin (R), misalnya resistan isoniazid dan etambutol (HE), rifampisin etambutol (RE), isoniazid etambutol dan streptomisin (HES), rifampisin etambutol dan streptomisin (RES).
- c. *Multidrug resistance* (MDR) : resistan terhadap isoniazid dan rifampisin, dengan atau tanpa OAT lini pertama yang lain, misalnya resistan HR, HRE, HRES.
- d. *Pre-extensive drug resistance* (pre-XDR) : MDR-TB disertai resistansi terhadap salah satu obat golongan fluorokuinolon atau salah satu dari OAT injeksi lini kedua (kapreomisin, kanamisin dan amikasin).
- e. *Extensive drug resistance* (XDR) : MDR-TB disertai resistansi terhadap salah satu obat golongan fluorokuinolon dan salah satu dari OAT injeksi lini kedua (kapreomisin, kanamisin dan amikasin).
- f. TB resistan rifampisin (TB-RR) : resistan terhadap rifampisin (monoresistan, poliresistan, MDR-TB, XDR-TB) yang terdeteksi menggunakan metode fenotip atau genotip dengan atau tanpa resistan OAT lainnya.

### 2.1.2 Faktor risiko MDR-TB

Faktor masalah terbesar yang mengakibatkan meningkatnya angka kejadian MDR-TB adalah kepatuhan pengobatan. Terdapat beberapa permasalahan utama penyebab kegagalan pengobatan TB yakni:<sup>17</sup>

- a. Aspek sosio-demografi dan ekonomi : kurangnya dukungan keluarga, dan kesulitan dalam mengakses fasilitas kesehatan akibat biaya, jarak, dan transportasi.
- b. Masalah pemahaman dan persepsi : ketidaktahuan akan resistansi akibat putus obat, serta persepsi negatif tentang pengobatan dan penyakit TB.
- c. Efek pengobatan TB yang lama dan gejala yang timbul akibat efek samping obat.

### 2.1.3 Patogenesis MDR-TB

Infeksi TB terjadi ketika seseorang menghirup droplet nukleus yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* yang mencapai alveoli paru-paru.<sup>18</sup> M.tb dapat berkembang biak secara intraseluler dan dapat menyebar melalui saluran limfatik atau melalui aliran darah ke jaringan dan organ lain seperti kelenjar getah bening, otak, dan tulang.<sup>19</sup> Dalam waktu 2 hingga 8 minggu, makrofag menelan dan mengelilingi M.tb. Sel-sel membentuk cangkang penghalang, yang disebut granuloma, yang menjaga M.tb terkendali. Bila granuloma gagal mengendalikan M.tb, akan terjadi kerusakan jaringan paru dan pembentukan rongga. M.tb dapat membentuk biofilm secara *in vitro*, yang akan mengeluarkan asam lemak bebas, membuat matriks ekstraseluler yang dapat melindungi bakteri dari respon kekebalan tubuh inang dan OAT di daerah nekrotik seperti rongga di paru-paru sehingga memungkinkan bakteri dapat bertahan (resistan) dan menular.<sup>20</sup>

Resistansi tuberkulosis pada Obat Anti Tuberkulosis (OAT) adalah keadaan dimana OAT tidak dapat untuk membunuh bakteri. Strain resistan muncul karena adanya perubahan atau mutasi gen tertentu dalam genom M.tb, dimana gen-gen ini adalah target dari mekanisme kerja OAT. Pertumbuhan yang lambat dan dorman sangat berperan dalam keparahan infeksi yang ditimbulkan. Jika sistem imun tubuh menurun dan adanya proses penuaan, maka infeksi dapat teraktivasi.<sup>21</sup>

#### 2.1.4 Penegakan Diagnosa MDR-TB

Menteri Kesehatan Republik Indonesia menetapkan alur penentuan diagnosis MDR-TB. Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan nomor 67 tahun 2016, penegakan diagnosis TB dapat dilakukan menggunakan Tes Cepat Molekuler (TCM). Pemeriksaan TCM merupakan metode deteksi molekuler berbasis *nested real-time* PCR. Penggunaan TCM menjadi prioritas pemeriksaan TB oleh karena mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya : Sensitivitas tinggi, hasil dapat diketahui dalam waktu kurang lebih 2 jam, dapat mendeteksi secara simultan dengan adanya bakteri M.tb dan resistansi terhadap rifampisin.<sup>22</sup>

Pemeriksaan TCM merupakan tes yang paling hemat biaya untuk semua kelompok pasien terutama bagi yang berisiko. Penggunaan pemeriksaan TCM dengan Xpert MTB/RIF dan dapat mengidentifikasi keberadaan M.tb dan resistansi terhadap rifampisin sehingga inisiasi dini terapi yang akurat dapat diberikan dan dapat mengurangi insiden TB secara umum. Pemeriksaan TCM ini digunakan untuk penegakan diagnosis TB, namun pemantauan kemajuan pengobatan akan tetap melakukan pemeriksaan sputum secara mikroskopik.<sup>23</sup>

#### 2.1.5 Tatalaksana MDR-TB

Golongan obat dalam panduan terapi MDR-TB dibedakan menjadi beberapa kelas. Menurut WHO, penggolongan terapi pengobatan MDR-TB dibagi menjadi tiga kelas, yaitu kelas A, kelas B dan Kelas C. Klasifikasi pengobatan MDR-TB dapat dilihat pada tabel 2.1

Tabel 2.1 Tatalaksana MDR-TB

Kelas WHO	Nama Obat	Efek	Dosis
A	Bedaquiline (BDQ)	Bersifat bakterisida	Standar : 400 mg secara oral (po) sekali sehari selama 2 minggu atau 200 mg (po) tiga kali seminggu.
			Alternatif : 200 mg (po) sekali sehari selama 8 minggu. Anak-anak : 100 mg (po), dosis maksimalnya

Lanjutan Tabel 2.1 Tatalaksana MDR-TB

Kelas WHO	Nama Obat	Efek	Dosis
			400/200 mg sekali setiap hari selama 2 minggu
A	Linezolid (LZD)	Bersifat bakteriostatik	Standar : 1200 mg sekali atau 600 mg (po) atau secara injeksi (iv) diberikan dua kali sehari. Alternatif : Disesuaikan dengan 600 mg (po) atau (iv) setiap hari setelah 3-4 minggu dosis standar. Anak-anak : Maksimal 600 mg/hari, berat badan lebih dari 16 kg dosisnya 10-12 mg/kg/hari (po)/(iv) sekali sehari Kontraindikasi : Obat ini harus dihindari pemberian bersamaan dengan obat petidin, tramadol, metadon, atau fentanil.
A	Levofloksasin (LFX)	Bersifat bakterisida	Standar : 750 mg (po)/(iv) sekali sehari. Alternatif : 1500 mg (po)/(iv) sekali sehari. Anak-anak : Maksimal 1-1,5 g/hari dan 15-20 mg/kg (po)/(iv) sekali sehari.
A	Moksifloksasin (MXF)	Bersifat bakterisida	Standar : 400 mg (po) sekali sehari. Alternatif : 600-800 mg (po) sekali sehari. Anak-anak : Maksimal 400 mg/hari dan 10-15 mg/kg (po)/(iv) sekali sehari.
B	Klofazimin (CFZ)	Bersifat bakterisida	Standar : 100 mg (po) sekali sehari. Alternatif : ≥ 200 mg (po) sekali sehari (apabila pasien dengan berat badan > 50 kg). Anak-anak : Maksimal 100 mg/hari dan 2-5 mg/kg (po) sekali sehari.

Lanjutan Tabel 2.1 Tatalaksana MDR-TB

Kelas WHO	Nama Obat	Efek	Dosis
B	Sikloserin atau terizidon (CYS/TRZ)	Bersifat bakteristatik	Standar : Maksimal 1000 mg/hari atau 10-15 mg/kg (po) Anak-anak : Maksimal 1000 mg/hari atau 15-20 mg/kg (po) satu dosis atau dua setiap hari.
C	Delamanid (DLM)	Bersifat bakterisida dan sterilisasi	Standar : Berat badan >50 kg : 100 mg (po) Berat badan 30-50 kg : 50 mg (po) diberikan dua kali sehari. Anak-anak : Maksimal 200 mg/hari. Jika < 3 tahun belum ada dosis yang tepat.
C	Amikasin (AMK)	Bersifat bakterisida	Standar : 15-20 mg/kg secara injeksi atau intramuskular (im) Alternatif : 15-20 mg/kg (iv) atau (im) dalam 2-3 kali seminggu.
C	Etionamid/proti onamide (ETH/PTH)	Bersifat bakteristatik	Standar : Maksimal 1000 mg/hari, 15-20 mg/kg (po) Anak-anak : Dosis maksimal 1000 mg/hari: 15-20 mg/kgBB dibagi dalam 2 atau 3 dosis.

Kelompok obat A termasuk fluoroquinolones, bedaquiline, dan linezolid sangat efektif dan dianjurkan dalam MDR-TB kecuali terjadi kontraindikasi. Klofazimine dan sikloserin atau terizidon termasuk dalam kelompok B. Obat-obatan ini direkomendasikan secara kondisional sebagai pilihan kedua. Obat-obatan kelompok C dapat digunakan ketika dosis yang memadai tidak dapat diformulasikan dengan agen dari kelompok A atau kelompok B. Agen dalam kelompok C diurutkan berdasarkan keseimbangan manfaat dengan toksisitas. Dosis pengobatan MDR-TB harus mencakup ketiga obat dari kelompok A dan setidaknya satu obat dari kelompok B. Dengan demikian, dosis harus mencakup setidaknya empat obat yang efektif dimana idealnya terdapat lima obat, pada saat dimulainya

pengobatan. Jika dosis obat tidak dapat dibuat berdasarkan dosis optimal yang melibatkan obat dari kelompok A dan B karena resistansi dan toksisitas obat, obat dari kelompok C dapat digunakan. Jika dosis tidak dapat mencakup ketiga obat dari kelompok A, pengobatan awal harus dimulai dengan lima obat, termasuk semua obat yang tersedia dikelompok A dan B.<sup>24</sup>

## 2.2 Sel Punca Mesenkimal

Sel punca mesenkimal (Mesenchymal stem cells, MSC) adalah sel punca multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel, diantaranya mesoderm, ektoderm, dan endoderm, dan termasuk osteoblas, kondrosit, miosit, adiposit, neurosit, dan hepatosit.<sup>25</sup> Sel punca mesenkimal banyak dikenal sebagai sumber sel dalam berbagai aplikasi klinis karena memiliki kemampuan yang baik sebagai perbaikan sel *in vitro* yang dapat bertahan selama lebih dari empat bulan.<sup>25</sup> Sel punca mesenkimal dapat diperoleh dari berbagai jaringan tubuh dewasa seperti sumsum tulang, lemak, tulang, darah jaringan neonatus (tali pusat, plasenta, cairan amnion, membran amnion), pulpa gigi, kulit.<sup>26</sup>

Sel punca mesenkimal dapat dijadikan sebagai strategi terapeutik yang menjanjikan dalam aplikasi pengobatan regeneratif karena kemampuan imunomodulatornya serta dapat berdiferensiasi menjadi fenotipe yang berbeda dan menghasilkan lingkungan regeneratif dengan sinyal parakrin yang menghambat pembentukan jaringan parut, apoptosis, mengurangi peradangan, serta mempromosikan angiogenesis.<sup>27</sup> Sinyal parakrin merupakan komunikasi intraseluler sel punca dengan sel dan matriks disekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepas oleh sel punca. Parakrin bertujuan untuk memicu aktivasi, inhibisi, diferensiasi atau proliferasi. Sinyal parakrin mengandung banyak molekul pensinyalan sel, termasuk mengeluarkan biomolekul seperti faktor pertumbuhan, sitokin dan kemokin yang membantu aktivitas biologis sesuai dengan lingkungan mikro yang melingkupinya. Efek sinyal parakrin yang disekresikan oleh sel punca mesenkimal disebut dengan sekretom.<sup>28</sup>

Molekul pensinyalan sel dalam efek parakrin, mengeluarkan biomolekul seperti *transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta$ 1), *tumor necrosis factor alpha*

(TNF- $\alpha$ ), *prostaglandin E2* (PGE2), *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ), *hepatocyte growth factor* (HGF), *transforming growth factor* (FGF), *indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase* (IDO), dan *nitric oxide* (NO), dan lain-lain.<sup>29</sup> Molekul pensinyalan sel dikemas dalam *extracellular vesicles* yang disekresikan oleh sel punca mesenkimal. *Extracellular vesicles* (EV) adalah transportasi pensinyalan dalam komunikasi antar sel. EV yang terikat membran akan disekresikan oleh sel somatik dan berkontribusi pada perbaikan jaringan, reproduksi, dan fungsi imunomodulator.<sup>30</sup>

Oleh karena itu, keberhasilan terapi sel punca mesenkimal ini harus mempertimbangkan banyak hal diantaranya proses homing, adhesi, kelangsungan hidup sel, imunomodulasi, angiogenesis, *engraftment*, serta penyatuan sel punca yang akan ditransplantasikan ke lokasi perbaikan jaringan.<sup>25,30</sup>

### **2.3 Peran Interferon-gamma Terhadap MDR-TB**

Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan dunia. Seseorang yang pernah terinfeksi M.tb ditemukan memiliki beberapa bentuk disfungsi paru yang menetap meskipun telah disembuhkan secara mikrobiologis.<sup>31</sup> Pada TB terjadi proses destruktif yang menyebabkan jaringan parut pada paru-paru, perubahan parenkim, bronkiektasis, penurunan volume paru, meningkatkan risiko obstruksi aliran udara dan penyakit paru obstruktif kronik (PPOK).<sup>32</sup> Selain itu, Penelitian menunjukkan bahwa ditemukan kerusakan paru-paru setelah pengobatan TB.<sup>33</sup>

Pada infeksi TB dan MDR-TB sitokin yang berperan dalam respon imun dan patologi adalah *Interleukin-10* (IL-10), *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ) dan *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ).<sup>34</sup> *Interferon-gamma* (IFN- $\gamma$ ) merupakan sitokin berupa protein berjenis glikoprotein yang disekresi oleh sel sebagai respon defensi akibat rangsangan biologis, seperti virus, bakteri, dan senyawa lainnya.<sup>35</sup> IFN- $\gamma$  memainkan peran penting dalam mengkoordinasikan respon imun bawaan dan adaptif sebagai agen imunomodulasi serta mengaktifkan banyak program antimikroba, melalui proses pensinyalan.<sup>36,37</sup> Dalam lingkungan inflamasi, IFN- $\gamma$  memicu aktivasi respon imun dan merangsang eliminasi patogen, serta mencegah aktivasi berlebihan dari sistem kekebalan dan kerusakan jaringan.<sup>35</sup>

Aktivasi makrofag oleh Limfosit-T akan memicu ekskresi sitokin IFN- $\gamma$  yang kemudian akan mengaktifkan makrofag yang menghasilkan lebih banyak enzim lisosom hidrolitik, oksida nitrat, dan radikal bebas yang menghancurkan mikroorganisme di dalam fagosom dan fagolisosom. Limfosit-T mengoordinasikan kekebalan terhadap bakteri intraseluler serta meningkatkan opsonisasi (penandaan) oleh makrofag yang akhirnya IFN- $\gamma$  akan berikatan dengan reseptor pada makrofag yang menghasilkan faktor pertumbuhan fibroblast dan faktor angiogenik untuk remodeling jaringan.<sup>38</sup>

IFN- $\gamma$  meningkatkan kekebalan yang diperantarai sel terhadap patogen intraseluler dengan mengaktifkan makrofag yang telah terinfeksi mikroba intraseluler seperti *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Leishmania donovani*, dan *Pneumocystis jiroveci* yang dapat tumbuh dalam vesikel endositik makrofag.<sup>39</sup>

## **2.4 Kultur Sel Punca Mesenkimal**

### **2.4.1 Mikroenkapsulasi**

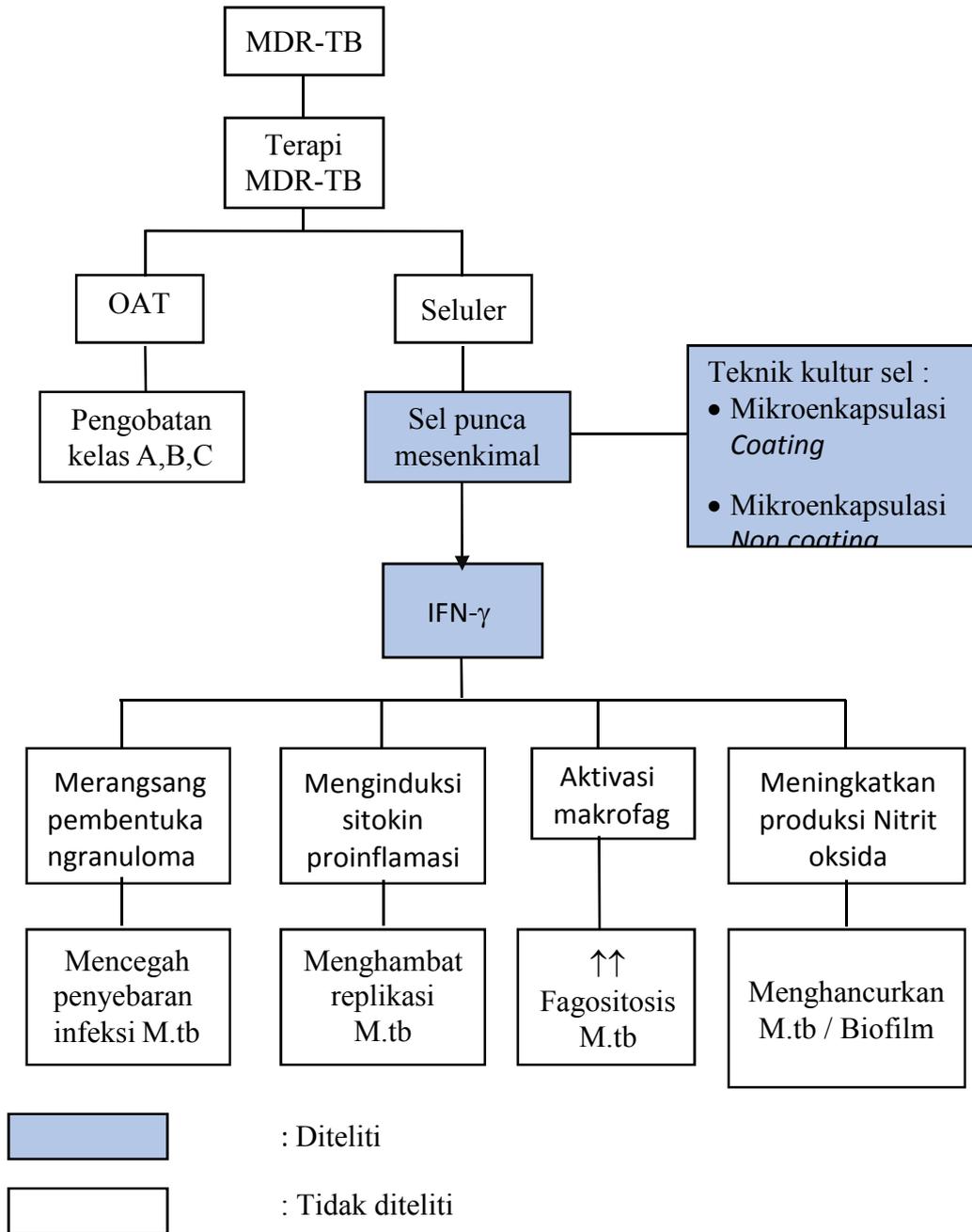
Mikroenkapsulasi adalah teknologi yang telah digunakan secara luas di berbagai bidang seperti pertanian, farmasi, makanan, dan industri lainnya. Mikroenkapsulasi berfungsi untuk membentuk struktur pertahanan atau pelindung kapsul untuk imobilisasi, perlindungan, pelepasan, dan fungsionalisasi bahan aktif. Mikroenkapsulasi juga merupakan perubahan zat menjadi partikel lebih kecil yang telah dibungkus atau dilapisi dengan bahan polimer yang berfungsi untuk menghantarkan partikel kecil yang disebut mikrokapsul atau mikrosfer. Mikroenkapsulasi juga memiliki tujuan agar menciptakan partikel molekul yang kuat melalui pelapisan untuk mengurangi kerusakan yang dapat terjadi.<sup>40,41</sup>

Pada teknik mikroenkapsulasi bahan yang digunakan dalam penyalutan dapat berupa polimer dengan memberikan lapisan tipis yang kohesif dengan bahan inti, yang harus bercampur secara kimia, tetapi tidak boleh bereaksi dengan inti (inert), dan harus memiliki sifat yang sesuai untuk keperluan penyalutan.<sup>40</sup>

### 2.4.2 *Coating*

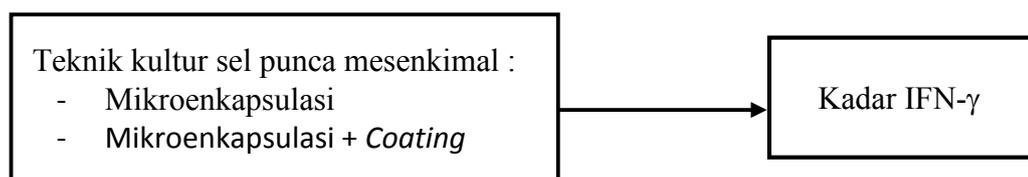
*Coating* bertujuan untuk dapat mempertahankan sel punca mesenkimal baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.<sup>42</sup> *Coating* mampu meningkatkan efisiensi, selektivitas, dan bioavailibitas, hal ini tergantung seberapa kuat *coating* dapat melindungi sel.<sup>43</sup> Setelah dikeluarkan dan diisolasi dalam jaringan, sel punca secara cepat dapat kehilangan status, fungsi, dan kelangsungan pada hidupnya.<sup>11</sup> Diperlukan adanya cara yang baik untuk dapat melindungi sel punca. Sehingga sel punca tidak kehilangan karakteristik intrinsiknya. Kemampuan untuk dapat mempertahankan sel punca serta jaringan yang dibangun oleh sel punca perlu ditingkatkan secara substansial untuk dapat mencapai standar klinis sebagai strategi terapeutik.

2.5 Kerangka Teori



Gambar 2.1 Kerangka Teori

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.2 Kerangka Konsep

## BAB 3

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik observasional

#### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di SCTE IMERI FK UI pada Agustus s/d Oktober 2023 dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Tahap I Agustus - September 2023 : isolasi, kultur dan kapsulasi sel punca mesenkimal
- b. Tahap II September - Oktober 2023 : uji kadar IFN- $\gamma$  pada kultur mikroenkapsulasi hari ke-2, ke-7, ke-14 dan ke-21 dengan pemeriksaan ELISA

#### 3.3 Prosedur Kerja

##### 3.3.1 Alat dan Bahan Penelitian

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 buah
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

Lanjutan Tabel 3.1 Alat dan Bahan Penelitian

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
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	IFN- $\gamma$ Kit Elisa	ELISA	1 buah

### 3.4 Cara Kerja

#### 1. Isolasi sel punca mesenkimal (*Mesenchymal stem cell*, MSC)

Sel punca mesenkimal diisolasi dari *Wharton's Jelly* tali pusat manusia menggunakan metode *multiple harvest explant* dengan beberapa modifikasi dan kemudian dikultur dalam *24 well kultur plate* menggunakan *media esensial alfa-minimal ( $\alpha$ MEM)* yang dilengkapi dengan lisat trombosit, Glutamax (Gibco), dan heparin. Sel dikultivasi pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> dan dipanen dengan *TrypLE Select*. setelah sel mencapai 70%-80% pertemuan. Ekspresi CD 105, CD 90, dan CD 73 diukur menggunakan *flow cytometry* mengikuti kriteria *International Society Cell and Gene Therapy* untuk sel punca mesenkimal.

#### 2. Kultur sel punca mesenkimal (*Mesenchymal stem cell*, MSC)

Kryopreservasi sel punca mesenkimal asal tali pusat dari penelitian sebelumnya deathawing dan dikultur dalam *T flask* dengan menggunakan medium kultur MEM yang disuplementasi dengan lisat konsentrat trombosit dan heparin. Pemeriksaan flowsitometri CD 105, CD 90, dan CD 73 dilakukan untuk menganalisa kemurnian sel punca mesenkimal berdasarkan kriteria *International Society Cell and Gene Therapy* terhadap CD 105, CD 90 dan CD 73. Sel punca diinkubasi dalam incubator 5% CO<sub>2</sub> 37°C. sel punca mesenkimal dipanen dengan *Triple Select* ketika konfluens 70 – 80% dan disubkultur dalam *T flask* dengan densitas 5000 sel/cm<sup>2</sup>. Jumlah sel dihitung dengan *trypan blue exclusion test*.

### 3. Mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal

Suspensi 1.600.000 sel punca mesenkimal dalam 0,4 mL medium kultur sel punca mesenkimal diletakkan dalam tube 1,5 mL. Kemudian, 3 mL larutan alginate 1,8% dicampurkan dengan 0,5 mL larutan yang berisi 8.000.000 sel punca. Larutan alginate 1,8% dan suspensi sel diteteskan ke dalam CaCl 0,2M dengan menggunakan spuit insulin. Untuk kelompok dengan coating lisat konsentrasi trombosit : 2 ml lisat konsentrasi trombosit + heparin 200mikro kapsul disuspensikan ke dalam lisat konsentrasi trombosit + heparin dan inkubasi selama 10 menit. Kemudian kapsul dimasukkan ke dalam alginate 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 *non coating* dengan lisat konsentrasi trombosit langsung cuci dimasukkan ke dalam *well* yang telah berisi medium kultur. Mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal dikultur dalam medium kultur selama 21 hari.

### 4. Uji kadar IFN- $\gamma$

Kadar IFN- $\gamma$  diukur dengan menggunakan medium kultur mikroenkapsulasi. Analisa dilakukan pada hari ke-2, hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21. Kit untuk mengukur kadar IFN- $\gamma$  menggunakan *Human ELISA Kit* IFN- $\gamma$  sesuai dengan petunjuk dari produsen. Sinyal absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450nm.

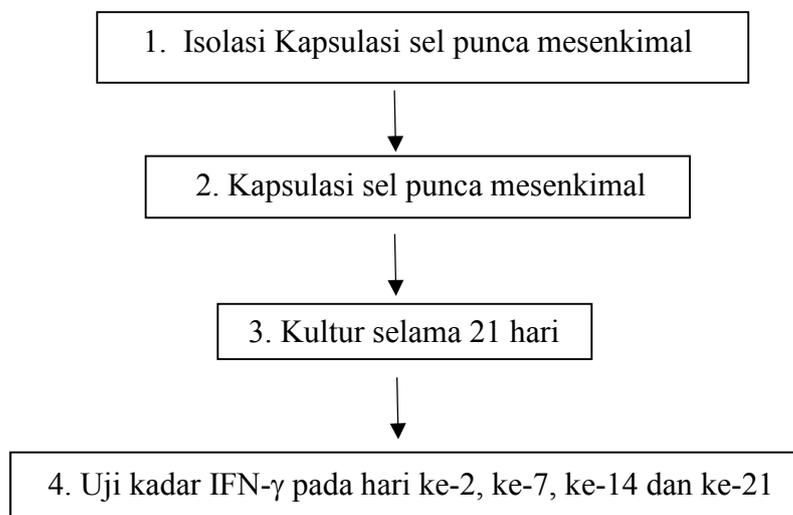
#### Analisa IFN- $\gamma$ dengan ELISA

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 JuL ke tabung S7, dan 200 uL ke tabung S6-S0. Masukkan standard yang sudah dilarutkan,

50 uL ke tabung S7, mix well. Kemudian 200 ML 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 uL Assay diluent RD1F ke masing-masing sumuran. Mix well sebelum digunakan. Pipet sebanyak 50 uL 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 HL 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 uL 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 uL 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 uL 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 570nm.

### 3.5 Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Prosedur Penelitian

### 3.6 Definisi Operasional

Tabel 3.3 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) merupakan sitokin yang berperan dalam sistem imun yang berfungsi sebagai aktivator makrofag.	Spektrofotometri	ELISA	Kadar IFN- $\gamma$ (pg/dl)	Rasio
Sel punca mesenkimal	Sel punca multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel dan memiliki kemampuan sebagai imunomodulator	flowsitometri	Kriteria <i>International Society Cell and Gene Therapy</i>	Analisa Kemurnian MSC	Nominal

Lanjutan Tabel 3.2 Definisi Operasional

<b>Variabel</b>	<b>Definisi</b>	<b>Alat Ukur</b>	<b>Cara Ukur</b>	<b>Hasil Ukur</b>	<b>Skala Ukur</b>
Isolasi	Pemisahan sel target kedalam suatu wadah	<i>TrypLE Select</i>	Kriteria <i>Internati onal Society Cell and Gene Therapy</i>	CD 105, CD 90, CD 73	Nominal
Kultur	Proses perpindahan sel ke dalam medium terkontrol yang sesuai untuk menumbuhkan sel	flowsito metri	Kriteria <i>Internati onal Society Cell and Gene Therapy</i>	Suspensi (pertumbu han) Sel	Rasio
Mikroenkapsulasi	Teknologi untuk menyalut atau melapisi suatu zat inti dengan suatu lapisan dinding polimer sehingga menjadi partikel berukuran mikro	<i>screening electron microscop e (SEM)</i>	Tetes sput insulin	Direndam dalam larutan alginate selama 10 menit	Rasio
<i>coating</i>	Metode untuk menutupi permukaan substrate dengan tujuan, yaitu untuk proteksi	<i>screening electron microscop e (SEM)</i>	Suspensi trombosit dan heparin	Direndam lisat konsentrat trombosit selama 10 menit	Rasio

### **3.7 Analisis Data**

Hasil absorbansi spektrofotometri pada penelitian ini dianalisis menggunakan uji T independen untuk membandingkan antara kelompok mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coating* dan *non coating*, dengan nilai  $p < 0,05$ . Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan menu analisis data pada perangkat lunak excel.