

LEMBAR PENGESAHAN  
LAPORAN HASIL PENELITIAN

Judul : Kadar IL-10 Mikrocapsulasi MSC-CD14 dalam konsentrasi hasil  
trombosit : Studi Preklinis terapi seluler MDR TB

Nama : Kharnis Marcha Madara Ginting

NPM : 20000018

---

Dosen Pembimbing I

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

Dosen Pembimbing II

(dr. Runggo Retno J. Napinipulu, M. Kes)

Dosen Penguji

(dr. Saharnauli V. Simorangkir, M. Biomed)

Ketua Program Studi Sarjana  
Kedokteran

(dr. Ade Pryta R. Simamane, M. Biomed)

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas HKBP Nommensen

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

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1.Latar Belakang.

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi menular yang diakibatkan oleh *mycobacterium tuberculosis* yang menginfeksi paru-paru. Selama beberapa tahun TB menjadi penyebab kematian utama di seluruh dunia.<sup>1</sup> *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri yang tidak memiliki spora dan merupakan basil gram positif yang termasuk famili *mycobacteriaceae*. *Mycobacterium tuberculosis* dapat mengakibatkan infeksi pada paru-paru serta organ tubuh lain seperti otak, ginjal dan tulang belakang.<sup>2,3</sup>

Penatalaksanaan TB umumnya menggunakan OAT (Obat Anti Tuberkulosis). Panduan standar untuk penatalaksanaan TB paru yaitu 2RHZE4RH (Rifampisin, Isoniazid, Pirazinamid, Etambutol), yaitu 2 bulan penggunaan isoniazid (INH) dan Rifampisin (RMP), Etambutol (EMB), dan Pirazinamid dan diikuti dengan 4 bulan menggunakan Rifampisin (RMP) dan isoniazid (INH).<sup>4</sup> Pengobatan TB harus diikuti dengan kepatuhan penderita terhadap pengobatan OAT yang dikonsumsi setiap hari. Selama bertahun-tahun pengendalian penyakit TB menggunakan OAT meningkatkan kualitas hidup penderita TB, tetapi angka keberhasilan pengobatan menggunakan OAT di Indonesia pada tahun 2020 hanya mencapai angka 82,7%.<sup>5</sup> Kegagalan pada terapi TB sering mengakibatkan resistensi obat anti tuberkulosis, yang lebih dikenal dengan sebutan TB resisten obat. Resistensi terhadap setidaknya 2 jenis obat anti tuberkulosis disebut sebagai *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR TB).<sup>4</sup>

Resistensi terhadap Rifampisin dikonfirmasi sebanyak 71% (2,4 -3,4 juta) pada tahun 2021. Angka ini menunjukkan peningkatan yang bermakna dari tahun 2020, dimana terdapat 61% (2,1-3,0 juta) kasus. Kondisi ini tentunya menjadi perhatian besar dunia kesehatan, karena setiap tahunnya terdapat peningkatan yang cukup signifikan. Tingkat keberhasilan pengobatan

menggunakan rejimen untuk resistensi obat juga hanya mencapai 60% pada tahun 2019.<sup>6</sup> Pengobatan dengan rejimen yang ada juga mengakibatkan

toksisitas. Kondisi ini membutuhkan adanya suatu terapi alternatif dalam menangani MDR TB.

Sel punca sudah populer digunakan dalam dunia kedokteran sejak tahun 1950-an. Sel punca mampu menggantikan sel tubuh yang rusak, belum berdiferensiasi (*undifferentiated*), mampu memperbanyak diri sendiri (*self renewal*) dan dapat berdiferensiasi menjadi lebih dari 1 jenis sel.<sup>7</sup>

*Mesenchymal stem cell* (MSC) merupakan sel punca yang bersifat multipotent, imunodulator, dan berasal dari jaringan-jaringan yang mudah diperoleh. MSC umumnya diperoleh dari sumsum tulang, tali pusat, jaringan adiposa, pulpa gigi, dan darah tepi. Efek parakrin dari MSC merupakan imunoregulator yang mendukung terjadinya regenerasi. Sel punca hematopoietik CD34 memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri dan mampu berdiferensiasi menjadi progenitor sel darah yang matur. Sel punca hematopoietik CD34 sudah sejak lama dikenal sebagai jenis sel punca terbaik yang dapat diperoleh dari sumsum tulang serta *umbilical cord blood cell*. MSC dan CD34<sup>+</sup> mengeluarkan sitokin sebagai efek parakrin yang dapat memicu proses fagositosis pada sel target.

Terapi MDR-TB dengan sel punca mesenkimal telah dilakukan pada beberapa penelitian sebelumnya dan terus menunjukkan kegagalan pengobatan. Hal ini dikarenakan fungsi imunomodulator, antiinflamasi sel punca mesenkimal dan regenerasi jaringan paru yang rusak tidak optimal. Kurangnya viabilitas sel punca mesenkimal selama terapi sel mengakibatkan kematian sel punca selama proses bermigrasi ke jaringan parenkim paru yang meradang, dan *homing* ke lingkungan inang yang kemudian menyebabkan kegagalan dalam terapi sel MDR-TB.<sup>8</sup> Enkapsulasi sel punca akan meningkatkan viabilitas sel punca sehingga meningkatkan kualitas hidup sel dalam proses migrasi dan *homing*. Microenkapsulasi sel punca pada penelitian ini akan menggunakan alginate yang dilapisi lagi dengan konsentrat lisat trombosit. Penggunaan alginat akan memberikan keuntungan seperti mudah larut dalam air, murah, biokompatibel, dan cepat bereaksi dengan Ca<sup>2+</sup>. Enkapsulasi menggunakan alginate akan melindungi sel punca dari zat

oksidatif, reaksi inflamasi, serta respon imun dari jaringan target. Enkapsulasi juga meningkatkan sekresi sitokin dan faktor pertumbuhan dari sel punca.<sup>9</sup> Konsentrat lisat trombosit sebagai suspensi trombosit konsentrat tinggi mengandung banyak faktor pertumbuhan seperti PDGF, EGF, FGF, IGF-1, IGF, dan VEGF yang dapat mendukung terjadinya regenerasi jaringan.<sup>10</sup>

Salah satu efek parakrin yang dihasilkan MSC yaitu interleukin 10.<sup>7,11</sup> Interleukin 10 dikenal sebagai sitokin yang memiliki sifat anti-inflamasi dan mengontrol respon imun. IL-10 dikenal sebagai sitokin yang mengatur sel T yang mengendalikan respon imun. Dalam eliminasi TB, IL-10 bekerja sebagai immunoregulator, mengontrol jumlah makrofag sehingga mengurangi kerusakan jaringan.<sup>12</sup>

Terapi alternatif menggunakan sel punca untuk kasus MDR TB memberikan harapan besar dalam aktivasi sel-sel imunitas dalam mengeliminasi bakteri. Teknik mikroenkapsulasi sel punca akan memungkinkan persistensi sel punca dalam proses migrasi menuju parenkim paru menjadi lebih baik. IL-10 sebagai efek parakrin dari MSC akan mengeliminasi bakteri *mycobacterium tuberculosis*. Hal ini lah yang melatarbelakangi penelitian ini, untuk mengetahui kadar dari interleukin 10 sebagai sitokin yang dihasilkan MSC dan CD34 yang dapat menjadi dasar bagi peneliti untuk mengembangkan MSC dan CD34 sebagai terapi alternatif dalam mengatasi MDR TB.

### **1.1 Rumusan Masalah**

Bagaimanakan gambaran kadar interleukin 10 terhadap mikroenkapsulasi MSC-CD34<sup>+</sup> yang disalut konsentrat lisat trombosit sebagai studi preliminari terapi seluler MDR TB?

## **1.2 Tujuan Penelitian**

### **1.2.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui kadar interleukin 10 terhadap mikroenkapsulasi MSC-CD34 yang disalut konsentrat lisat trombosit sebagai studi preliminari terapi seluler MDR TB

### **1.2.2 Tujuan Khusus**

Yang menjadi tujuan khusus dalam penelitian ini adalah : Untuk mengetahui kadar interleukin 10 terhadap mikroenkapsulasi MSC-CD34<sup>+</sup> yang disalut konsentrat lisat trombosit sebagai studi preliminari terapi seluler MDR TB.

## **1.3 Manfaat penelitian**

### **1.3.1 Bagi Masyarakat**

Manfaat penelitian ini bagi masyarakat yaitu untuk mengetahui alternatif terapi MDR TB.

### **1.3.2 Bagi Peneliti**

Manfaat penelitian ini bagi peneliti adalah untuk menambah ilmu pengetahuan mengenai interleukin 10 sebagai efek parakrin dari mikroenkapsulasi MSC-CD34<sup>+</sup> yang disalut konsentrat lisat trombosit sebagai studi preliminari terapi seluler MDR TB

### **1.3.3 Bagi Institusi**

Manfaat penelitian ini bagi institusi yaitu sebagai studi pendahuluan untuk riset berikutnya mengenai terapi alternatif pada MDR TB.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Tuberkulosis**

##### **2.1.1 Defenisi**

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi menular yang diakibatkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Selama beberapa tahun TB menjadi penyebab kematian utama di seluruh dunia.<sup>1</sup> TB termasuk penyakit menular, dapat menyerang berbagai organ terutama paru-paru.

##### **2.1.2 Etiologi**

*Mycobacterium tuberculosis* merupakan patogen penyebab penyakit tuberkulosis. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri berbentuk batang yang tidak memiliki spora berukuran 0,5 µm X 3 µm dan merupakan basil gram positif yang termasuk famili *Mycobacteriaceae*. *Mycobacterium tuberculosis* termasuk bakteri tahan asam, karena tersusun dari kandungan asam mikolat yang tinggi dan dilapisi oleh dinding lipid.<sup>13</sup> *Mycobacterium tuberculosis* dapat menyebar melalui droplet saat penderita bersin atau batuk kemudian mengakibatkan infeksi pada paru-paru. Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* juga dapat menyerang organ lain otak, ginjal dan tulang belakang.<sup>2</sup>

##### **2.1.3 Gejala Klinis**

Infeksi TB yang menyerang organ paru secara umum menunjukkan gejala batuk yang berkepanjangan disertai nyeri dada. Gejala klinis yang ditemui pada penderita TB yaitu keringat malam, penurunan berat badan yang progresif, kelelahan yang tidak normal, demam, dan batuk berdarah.<sup>14,15</sup>

##### **2.1.4 Penegakan Diagnosa**

Untuk semua kasus dengan gejala TB, WHO merekomendasikan untuk melakukan tes cepat menggunakan tes Xpert MTB/RIF. Dapat dilakukan tes kulit tuberculin (TST) atau interferongamma release assay (IGRA) untuk mengidentifikasi orang yang terinfeksi. Standar baku diagnosa TB paru dilakukan dengan tes BTA sputum dan radiografi thorax. Pemeriksaan radiografi thorax dilakukan untuk melihat letak lesi dan menyingkirkan kemungkinan penyakit lain.<sup>1,14</sup>

a. Tes BTA sputum

Tes BTA (basil tahan asam) merupakan pemeriksaan mikroskopis menggunakan mikroskop smear dengan objek pemeriksaan berupa sputum penderita. Tes dilakukan dengan apusan *Ziehl-neelsen* dengan pewarnaan basil carbol-fuschien. Sputum diambil secara bertahap yaitu sewaktu-pagi-sewaktu, saat penderita datang, lalu sputum pagi hari dan saat penderita daaing kedua kali. Tes BTA saat ini dianggap opsi yang cepat dan murah untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri *M.tuberculosis*, akan tetapi kekurangan tes ini yaitu hanya positif terhadap kasus TB aktif.<sup>16</sup>

b. Radiografi Thorax

Radiografi thorax pada penderita TB paru bertujuan untuk mengetahui letak lesi penderita. Hasil foto thorax penderita TB paru umumnya menggambarkan lesi pada bagian lapang paru bagian atas atau daerah apex paru. Lesi TB paru juga dapat muncul di lapang paru lain,dapat berbeda dalam ukuran, bentuk, densitas, dan kavitasinya.<sup>17</sup>

### 2.1.5 Terapi/Penatalaksanaan

Terapi untuk infeksi tuberkulosis menggunakan terapi kombinasi obat anti tuberkulosis (OAT). OAT lini pertama untuk kasus TB paru teridri atas ethambutol (EMB), isoniazid (INH), pyrazinamide (PZA) dan rifampicin (RIF) . Fase intensif dari pengobatan TB dilakukan dengan kombinasi 4 OAT lini pertama selama 2 bulan. Fase lanjutan dilakukan untuk membunuh sisa kuman dalam tubuh sehingga memperkecil kemungkinan TB berulang. Pengobatan fase lanjutan dilakukan selama 4 bulan dengan pemberian OAT yaitu rifampicin dan isoniazid setiap hari.<sup>18,19</sup>

## 2.2. *Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR TB)*

### 2.2.1 Definisi

MDR TB didefinisikan sebagai resistensi terhadap abat anti tuberkulosis lini pertama yaitu rifampisin dan isoniazid . Resistensi obat terhadap *mycobacterium tuberculosis* disebabkan oleh mutasi kromosom yang menghasilkan kerentanan terhadap agen spesifik. Resistensi obat dapat terjadi dengan 2 cara yaitu resistensi primer dan resistensi sekunder. Resistensi primer

terjadi ketika bakteri TB yang sudah resisten obat berpindah dari satu individu ke individu lain secara langsung. Resistensi sekunder adalah resistensi yang terjadi karena ketidakpatuhan terhadap pengobatan, rejimen yang tidak memadai, dan kegagalan pengobatan. Tanda dan gejala penderita MDR TB tidak berbeda jauh dari penderita TB pada umumnya. Terjadi penurunan berat badan dan kelelahan, serta terjadi batuk dengan produksi sputum disertai nyeri dada. Pada kasus MDR TB, terjadi resistensi sehingga bakteri lebih lama tereliminasi atau bahkan tidak tereliminasi sama sekali sehingga tanda dan gejala klinis yang dialami pasien bertahan lebih lama.<sup>20,21</sup>

### 2.2.2 Penegakan Diagnosa

MDR TB merupakan kasus resistensi terhadap *mycobacterium tuberculosis*, sehingga untuk mendiagnosa kondisi ini, dilakukan uji kepekaan terhadap *m.tuberculosis*. Metode untuk uji kepekaan *m.tuberculosis* dilakukan dengan metode fenotipik dan metode genotipik.<sup>19</sup>

#### a. Metode fenotipik

Metode fenotipik bertujuan untuk menguji kepekaan obat-obatan seperti isoniazid (INH), ofloksasin/levofloksasin, kanamisin, kapreomisin, moksifloksasin. Metode fenotipik menggunakan media padat (Lowenstein Jensen / LJ) dan media cair (mycobacteria growth indicator tube/ MGIT). Metode fenotipik dengan menggunakan media padat Lowenstein Jensen dilakukan dengan melihat pertumbuhan *M.tuberculosis* yang divisualisasikan oleh koloni kasar yang khas dan formasi cording.<sup>19,22</sup>

#### b. Metode genotipik

Metode genotipik bekerja dengan cara mendeteksi DNA spesifik yang terkait dengan resistensi obat anti tuberkulosis. Metode genotipik memiliki banyak keunggulan yaitu hasil yang cepat dan standarisasi pengujian yang tinggi.<sup>22</sup> Metode genotipik terdiri atas:

##### 1) Xpert MTB/RIF atau Tes cepat molekuler (TCM)

Xpert MTB/RIF atau lebih dikenal dengan tes cepat molekuler merupakan tes amplifikasi asam nukleat yang otomatis mendeteksi

TB dan uji kepekaan untuk rifampisin. Hasil pemeriksaan dapat diketahui dalam waktu kurang lebih 2 jam

2) Line probe assay (LPA)

Line probe assay terdiri atas Hain test/Genotype MTBDR plus (LPA lini pertama) dan MTBDRsl (LPA lini kedua). LPA lini pertama untuk mendeteksi resistansi terhadap obat rifampisin dan isoniazid. LPA lini kedua untuk mendeteksi resistansi pada obat golongan flurokuinolon dan obat injeksi lini kedua. Hasil pemeriksaan didapatkan setelah 48 jam.<sup>19</sup>

### 2.2.3 Terapi/Penatalaksanaan

Tujuan terapi MDR TB yaitu untuk menyembuhkan dan mencegah penyebaran bakteri yang telah resisten obat menyebar ke orang lain.<sup>23</sup> Untuk pilihan pengobatan, WHO memperbaharui pilihan pengobatan untuk MDR TB yaitu pada bulan desember tahun 2022, dengan menyarankan pemilihan rejimen pengobatan 6 bulan yang terdiri dari bedaquiline, pretomanid, linezolid (600 mg), dan moksifloksasin (BPaLM) untuk mengganti terapi 9 bulan atau 18 bulan pada pasien MDR TB.

a. Regimen pengobatan 6 bulan

Rejimen BPaLM, terdiri dari bedaquiline, pretomanid, linezolid (600 mg selama 26 minggu) dan moxifloxacin. Setelah uji resistensi terhadap fluoroquinolon, dan ternyata negative, maka moxifloxacin tidak diteruskan lagi, dan hanya menggunakan rejimen BPaL.

b. Regimen 9 bulan

Regimen selama 9 Terdiri dari, fase intensif yaitu bedaquiline dikombinasikan dengan levofloxacin atau moxifloxacin, ethionamide atau linezolid di dosis 600 mg setiap hari, etambutol, isoniazid dosis tinggi, pirazinamid dan klofazimin, diberikan selama 4 bulan, kecuali bedaquiline diberikan selama 6 bulan dan linezolid diberikan selama 2 bulan. lalu, fase lanjutan terdiri dari fluoroquinolones, klofazimin, etambutol, dan pirazinamid yang diberikan selama 5 bulan.

Fase intensif dapat diperpanjang hingga 6 bulan ketika tidak ditemukan perubahan dari uji bakteriologis pada bulan ke empat, sehingga jika dihitung, seluruh rejimen dapat digunakan selama 11 bulan

Dua rejimen adalah sebagai berikut:

4-6 Bdq(6m)-FQ-Cfz-Z-E-Hh-Eto/5 FQ-Cfz-ZE (variasi etionamid)

4-6 Bdq(6m)-Lzd(2m)-FQCfz-Z-E-Hh/5FQ-Cfz-Z-E(variasi linezolid)

c. Rejimen yang lebih lama untuk kasus MDR

Rejimen ini diberikan selama 18-20 bulan dengan pemberian obat grup A (moxifloxacin/levofloxacin, bedaquiline, linezolid), grup B (cycloserine/terizidone, clofazimine), dan grup C (amikacin/streptomycin, ethambutol, prothionamide, pyrazinamide). Jika hanya satu atau dua agen grup A yang digunakan, kedua agen grup B harus disertakan. Jika rejimen tidak dapat disusun dengan agen dari Grup A dan B saja, maka tambahkan Grup C untuk melengkapinya.<sup>24,25</sup>

### **2.3. Mesenchymal Stem Cell (MSC)**

Sel punca mesenkimal (MSCs) adalah jenis sel punca dewasa yang bersifat multipotent, yang dapat diisolasi dari berbagai jaringan dalam tubuh, seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, dan jaringan tali pusat. MSC memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, termasuk sel tulang, tulang rawan, dan sel lemak, memiliki sifat imunomodulator yang memberikan kemungkinan baik menggunakan MSC dalam pengobatan regeneratif dan imunoterapi. MSC yang berasal dari tali pusat memiliki beberapa keunggulan dibandingkan yang berasal dari sumber lain. MSC yang bersumber dari tali pusat mudah diperoleh dan memiliki tingkat proliferasi yang lebih tinggi daripada yang berasal dari sumber lain. MSC yang berasal dari tali pusat memiliki risiko penularan infeksi yang lebih rendah, dan MSC yang berasal dari tali pusat telah terbukti memiliki sifat imunomodulator yang tinggi.<sup>26,27</sup>

### 2.3.1 Efek parakrin MSC

Efek terapeutik MSC bergantung pada lokasi sel target, kemampuan migrasi dan melekat (*homing*) pada sel target. Beberapa faktor yang mempengaruhi kemampuan *homing* MSC diantaranya kondisi kultur dan penerimaan sel inang yang memainkan peranan penting. MSC dapat diidentifikasi berdasarkan *Cluster of Differentiation* (CD) berupa CD105, CD73 dan CD90. Dalam proses migrasi mencapai sel target, MSC diidentifikasi melepaskan banyak sel kemokin dan faktor pertumbuhan seperti EGF, VEGF-A, FGF, PDGF-AB, HGF, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , SDF-. MSC memiliki efek imunomodulasi seperti aktivasi dan proliferasi yang menekan respons imun. MSC menekan proliferasi sel T dengan mensekresikan zat seperti indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) dan prostaglandin E2 (PGE2). MSC juga menekan perkembangan sel Th17 pro inflamasi dan merangsang sel T regulator untuk melepaskan efek sitokin seperti IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ , dan HGF.<sup>28</sup>

### 2.4. Sel Punca Hematopoietik CD34<sup>+</sup>

Sel punca hematopoietik merupakan sel punca yang bersifat multipotent, memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri dan menyusun kembali serta mampu berdiferensiasi menjadi progenitor dari seluruh garis turunan sel darah yang matur. Sel punca hematopoietik sudah sejak lama dikenal sebagai jenis sel punca terbaik yang dapat diperoleh dari sumsum tulang serta darah tali pusat. CD34<sup>+</sup> merupakan penanda dari sel punca hematopoietik.<sup>7</sup>

#### 2.4.1 Efek parakrin sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup>

Sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> mensekresikan faktor angiogenik seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *hepatic growth factor* (HGF), *insulin growth factor-1* (IGF-1), interleukin-8 (IL-8), *fibroblast growth factor* (FGF), dan angiopoietin-1. HSC mengeluarkan imunomodulasi dan anti-inflamasi seperti TGF- $\gamma$ , IL 10, IL-4, IL-6, PGE2, M-CSF, G-CSF, adenosine, dan lain-lain. IL-10 dan TGF- $\gamma$  merupakan anti-inflamasi yang paling sering diekspresikan dan memainkan peran kunci dalam imunomodulasi dan anti-inflamasi pada sel CD34<sup>+</sup>.<sup>29</sup>

## **2.5. Enkapsulasi sel punca**

### **2.5.1 Defenisi**

Enkapsulasi merupakan metode untuk melindungi senyawa bioaktif dengan cara melapisi suatu senyawa dengan senyawa lain. Enkapsulasi sel adalah bioteknologi yang menggunakan membrane isolasi imun semipermeable untuk melapisi sel alogenetik atau xenogenik hidup untuk tujuan aplikasi terapeutik. Ada beberapa komponen mikrokapsul, yaitu polimer, sel yang dienkapsulasi, transgen terapeutik, dan vektor DNA. Sel yang dienkapsulasi akan dikenali oleh imun inang sel melalui pertukaran mediator imun dua arah, yang menginduksi respon imun adaptif dan bawaan terhadap kapsul yang dicangkokkan. Metode enkapsulasi akan menekan imunogenisitas sel sehingga menurunkan reaksi sel imun terhadap sel yang dienkapsulasi.<sup>30</sup>

### **2.5.2 Jenis enkapsulasi**

Berdasarkan ukurannya, enkapsulasi dapat dikelompokkan menjadi makroenkapsulasi dan mikroenkapsulasi. Makroenkapsulasi sel dilakukan dengan imobilisasi dalam ruang difusi yang relatif besar, dan bersifat semipermeable. Makroenkapsulasi sel menunjukkan hasil yang sangat baik dalam Teknik *in vivo* sebagai potensi terapeutik. Kelemahannya, teknik makroenkapsulasi membutuhkan kebutuhan nutrisi dan oksigen dalam jumlah besar untuk mencapai difusi yang memadai ke dalam kapsul.<sup>30,31</sup>

Mikroenkapsulasi sel merupakan alternatif untuk meningkatkan rasio permukaan atau volume dan meningkatkan difusi nutrisi dan oksigen di dalam kapsul. Mikroenkapsulasi sel didasarkan pada imobilisasi sel yang menghasilkan molekul secara terapeutik dalam partikel berdiameter antara 100 dan 1500  $\mu\text{m}$ . Partikel merupakan bahan biokompatibel dan biasanya dikelilingi oleh membran polimer semi permeabel yang mencegah lewatnya molekul dengan berat molekul tinggi, antibodi dan komponen lain dari sistem kekebalan tubuh. Alginat merupakan polimer enkapsulasi yang paling banyak digunakan, baik secara tunggal ataupun dikombinasikan dengan polimer lain. Alginat adalah polisakarida alami yang dimurnikan dari alga (meskipun dapat juga diproduksi oleh beberapa bakteri), dengan biokompatibilitas dan biodegradabilitas yang

sangat baik (Murua et al, 2008; Lee dan Mooney, 2012; Gasperini et al, 2014). Mikroenkapsulasi melindungi sel didalamnya dari imun inang dan dari tekanan mekanis.<sup>30-32</sup>

### **2.5.3 Manfaat enkapsulasi**

Teknik enkapsulasi meningkatkan permeabilitas sel dalam proses migrasi menuju sel target. Mikroenkapsulasi meningkatkan difusi oksigen dan nutrisi untuk sel karena meningkatkan rasio dan volume permukaan. Teknik enkapsulasi menekan aktivitas sel imun tubuh dalam fungsi eliminasi, sehingga kemungkinan sel sampai pada sel target menjadi lebih baik. Penggunaan polimer alginate dalam enkapsulasi meningkatkan biokompatibilitas sel.<sup>30,31</sup>

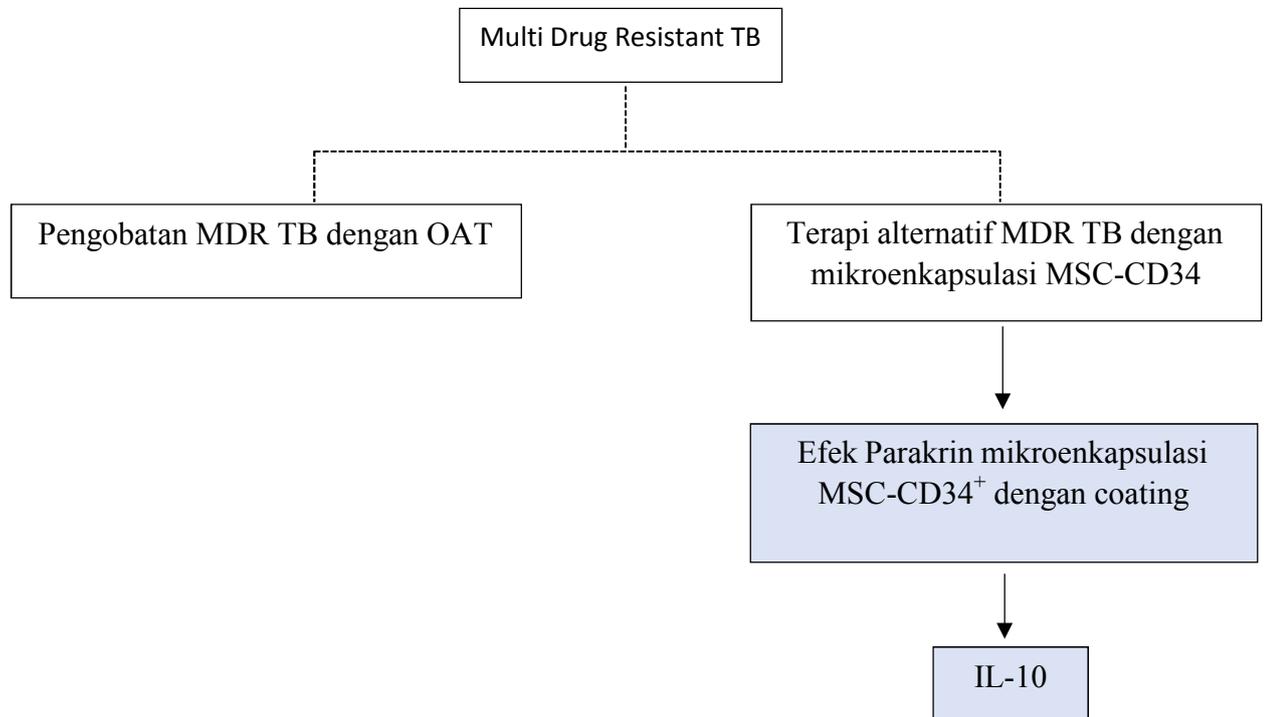
### **2.5.4 Enkapsulasi sel punca dan keuntungannya**

Sel punca memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi dan memperbanyak diri. Dengan kemampuan ini, sel punca mampu memperbaiki kerusakan jaringan dengan pengelolaan yang tepat. Sel punca juga melepaskan efek sitokin dan *growth factor* yang memicu proses imunodulator.<sup>7,28</sup> Untuk mempertahankan sel punca mencapai sel target, sel punca kemudian dikultur dan di enkapsulasi dengan metode mikroenkapsulasi. Mikroenkapsulasi sel punca menggunakan alginate dengan tujuan mempertahankan viability sel punca dan menjaga sel punca dari efek imunodulator. Enkapsulasi sel punca akan memungkinkan proses imigrasi menuju sel target menjadi lebih baik.<sup>28,30</sup>

## **2.6. Interleukin 10 (IL-10)**

Interleukin 10 adalah sitokin dengan sifat antiinflamasi yang diproduksi oleh sel-sel kekebalan tubuh seperti makrofag dan subset sel T. Interleukin 10 mengatur fungsi banyak sel imun yang berbeda, seperti menghambat presentasi antigen, mengurangi produksi mediator inflamasi. Pada MSC, Interleukin 10 dilepaskan sebagai sitokin immunoregulator. Pada CD34<sup>+</sup>, interleukin 10 akan disekresikan sebagai immunomodulasi dan sebagai anti-inflamasi. Respon Interleukin diharapkan menekan efek kinerja system imun selama proses imigrasi MSC dan CD34<sup>+</sup> menuju sel target.<sup>26,29,33</sup>

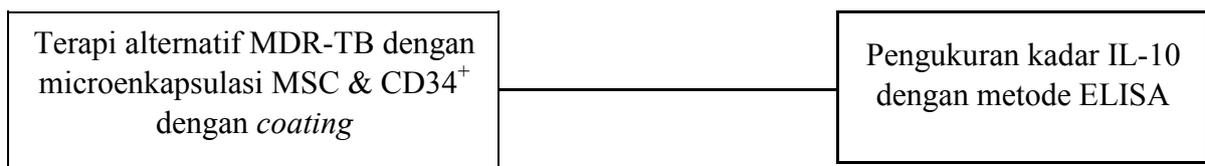
## 2.7. Kerangka Teori



 : diteliti

 : Tidak diteliti

## 2.8. Kerangka Konsep



## BAB 3

### METODE 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 sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup>
3. Uji kadar IL-10 dengan pemeriksaan ELISA

#### 3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

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

1. Tahap I Agustus - September 2023 : Isolasi, kultur dan kapsulasi MSC dan sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup>
2. Tahap II September – Oktober 2023 : Uji kadar IL-10 pada kultur mikroenkapsulasi ke-2, ke-7, ke-14 dan ke-21 dengan pemeriksaan ELISA

#### 3.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa duplo yang dikelompokkan menjadi 4 kelompok berdasarkan hari pemeriksaan. Total sampel penelitian adalah 8.

#### 3.4. 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
7	Tip 10 micro	Kapsulasi, ELISA	2 boks
8	Tip 20 micro	Kapsulasi, ELISA	1 boks

9	Tip 100 micro	Kapsulasi, ELISA	1 boks
10	Tip 200 micro	Kapsulasi, ELISA	1 boks
11	Tip 1000 micro	Kapsulasi, ELISA	1 boks
12	Tube 5 mL	Kapsulasi, ELISA	1 boks
13	Tube PCR	Kapsulasi, ELISA	1 boks
14	Mikropipet 10	Kapsulasi, ELISA	1 buah
15	Mikropipet 20	Kapsulasi, ELISA	1 buah
16	Mikropipet 100	Kapsulasi, ELISA	1 buah
17	Mikropipet 1000	Kapsulasi, ELISA	1 buah
19	IL-10 Kit Elisa	ELISA	1 buah

### 3.5. Cara Kerja

#### 3.5.1 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. 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. Penghitungan sel dilakukan dengan menggunakan *tryphan blue* dan kemurnian sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> dianalisa dengan menggunakan flowsitometri.

#### 3.5.2 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 sel punca mesenkimal berdasarkan kriteria *International Society Cell and Gene Therapy* terhadap CD105, CD90, dan CD73. Sel punca mesenkimal diinkubasi dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°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*.

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

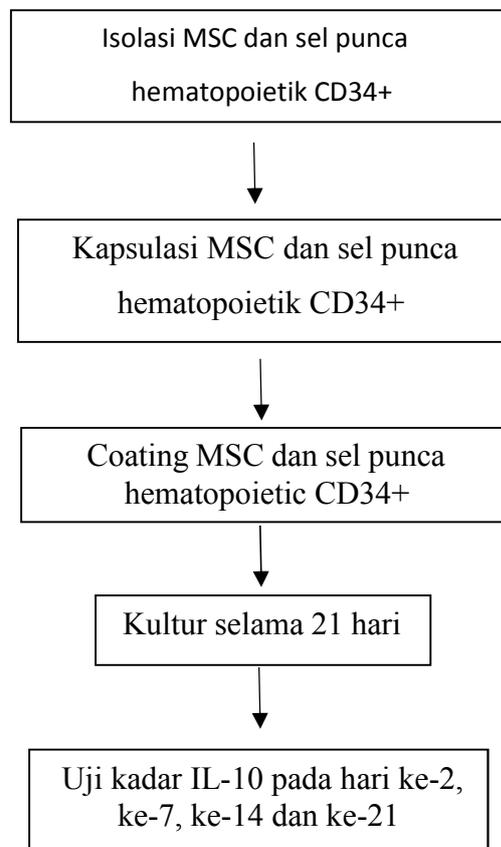
Suspensi 1.600.000 MSC dalam 0,4 mL medium kultur MSC dan suspensi 800.000 sel punca hematopoietik dalam 0,25 mL medium kultur CD34<sup>+</sup>, dicampur dalam tube 2 mL. Total larutan sel adalah 0,6 mL dengan jumlah 2.400.000 sel punca. 2,4 mL larutan larutan alginat 1,8% dicampurkan dengan 0.6 mL larutan yang berisi 2.400.000 sel punca. Larutan alginat 1,8% dan suspensi sel diteteskan ke dalam CaCl 0,2M dengan menggunakan spuit insulin. 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. Mikroenkapsulasi MSC dan sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> dikultur dalam medium kultur MSC selama 21 hari.

### **3.5.4 Analisa IL-10 dengan ELISA**

1. Keluarkan reagen yang akan digunakan 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. Beri label S0 (0 pg/mL, hanya pelarut saja) sampai S6 (500 pg/mL).
3. Masukkan larutan *Calibrator diluent RD5C* sebanyak 900 µL ke tabung S6, dan 500 µL ke tabung S5 - S0.
4. Masukkan standard yang sudah dilarutkan, 100 µL ke tabung S6, mix well.
5. Kemudian 500 µL dari tube S6 dipipet ke tube S5 dan seterusnya sampai tube S1. S0 adalah zero standard.
6. Siapkan microplate strips dan sampel dan tentukan peta plate.

7. Pipet sebanyak 200  $\mu\text{L}$  standar dan sampel ke masing-masing sumuran.
8. Tutup plate dengan adhesive strips, inkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam.
9. Buang larutan, tepuk-tepuk plate dengan posisi terbalik di atas paper towel. Tambahkan 400  $\mu\text{L}$  wash buffer ke masing-masing sumuran menggunakan pipet multichannel.
10. 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.
11. Tambahkan 200  $\mu\text{L}$  Conjugate ke masing-masing sumuran dan tutup dengan adhesive strips yang baru. Inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang.
12. Selesai inkubasi, ulangi tahap 9. Buat substrat solution.
13. Tambahkan 200  $\mu\text{L}$  Substrat Solution ke masing-masing sumuran dan inkubasi selama 20 menit dalam suhu ruang. Tutup dan lindungi dari cahaya.
14. Setelah inkubasi tambahkan 50  $\mu\text{L}$  Stop Solution ke masing-masing sumuran dan baca sampel pada panjang gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan Stop Solution.
15. Baca pada panjang gelombang 450nm. Bila wavelength correction tersedia, atur ke 540 nm atau 570 nm.

### 3.6. Prosedur Penelitian



### 3.7. Defenisi Operasional

**Tabel 3.2 Definisi Operasional**

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Skala ukur	Hasil Ukur
Interleukin 10	Interleukin 10 adalah sitokin dengan sifat antiinflamasi yang diproduksi oleh sel-sel kekebalan tubuh seperti makrofag dan subset sel T.	Spectrophotometer	ELISA	Rasio	Kadar IL10

### **3.8. Analisa Data**

Data akan dianalisis menggunakan excel,dan disajikan dalam bentuk diagram