

**LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN HASIL PENELITIAN**

Judul

Dosen Pembimbing II

(dr. Evina Julian Sitanggang, M.Biomed) (dr. Rungga Ratu J. Napitupulu, M.Kes) ←

Dosen Penguji

Ketua PSSH Sarjana Kedokteran

(dr. Ratasha Nainggolan, M.Kes
(ClinPath), Sp.PK)

(dr. Ade Pyta R. Simanungur,
M.Biomed)

**Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas HKBP Nommensen**

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) adalah keadaan tubuh pasien penderita tuberkulosis resisten terhadap setidaknya 2 jenis Obat Anti Tuberkulosis (OAT) yaitu rifampisin dan isoniazid yang merupakan obat penting yang digunakan dalam pengobatan penyakit tuberkulosis.¹ Tren kasus MDR-TB di dunia meningkat setiap tahun. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan terdapat 450.000 kasus MDR-TB dengan angka kematian sebesar 191.000 orang di seluruh dunia pada tahun 2021. Jumlah ini meningkat sebesar 3,1% dari tahun 2020 dengan jumlah 437.000 kasus.² Angka penderita MDR-TB sebanyak 206.030 kasus pada tahun 2019 dan sebanyak 186.883 kasus pada tahun 2018.³

Indonesia merupakan salah satu dari 10 negara dengan tingkat kejadian MDR-TB tertinggi di dunia.² Insiden MDR-TB di Indonesia pada tahun 2017 berjumlah 12.000 kasus terjadi peningkatan di tahun 2018 dengan jumlah 24.000 kasus.^{4,5} Berdasarkan data rekam medis RSUP Haji Adam Malik Medan ditemukan jumlah kasus MDR-TB pada tahun 2019 sebanyak 385 kasus, pada tahun 2021 sebanyak 202 kasus dan pada tahun 2022 mengalami peningkatan sebanyak 492 kasus.⁶

Sebagian besar pasien MDR-TB mengalami efek samping selama minum OAT. Efek samping yang paling sering dirasakan pasien selama terapi adalah mual dan muntah. Efek samping lainnya antara lain, gangguan tidur, perubahan warna di kulit, gangguan jantung, nyeri badan, pusing, nyeri pada bekas injeksi, keringat berwarna coklat dan rasa gelisah.⁷ Berbagai efek samping yang dialami oleh pasien yang mengkonsumsi OAT tersebut menyebabkan dibutuhkan strategi baru mengembangkan terapi non-antibiotik alternatif untuk membasmi patogen infeksius.⁸ Terapi alternatif MDR-TB dengan toksisitas yang lebih rendah,

durasi pengobatan yang tidak lama serta harga yang ekonomis sangat penting untuk ditemukan.⁹

Terapi menggunakan sel punca mesenkimal dan sel punca hematopoietik CD34 dipikirkan sebagai alternatif dalam pengobatan MDR-TB. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) merupakan sel stroma yang multipoten dan banyak ditemukan di jaringan tubuh, seperti di sumsum tulang, plasenta, jaringan lemak, timus, jaringan tali pusat dan sebagainya. MSC mempunyai kemampuan untuk diferensiasi menghasilkan banyak sel, regenerasi jaringan yang tinggi, dan merangsang neoangiogenesis.^{9,10} MSC menghasilkan faktor anti mikroba untuk menyingkirkan *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) melalui sekresi sitokin imunomodulator dan anti inflamasi serta memicu respon imun bawaan sehingga dapat memulihkan epitel paru yang rusak.⁹ CD34⁺ merupakan salah satu protein penanda permukaan yang umum dari sel punca hematopoietik. CD34⁺ memiliki kemampuan dalam meningkatkan angiogenesis dan meningkatkan perbaikan jaringan vaskular.¹¹ Interaksi CD34⁺ dengan *M.tb* akan meningkatkan sekresi sitokin anti inflamasi dan memberikan efek terapeutik pada organ paru yang telah terinfeksi.¹²

Penelitian yang dilakukan oleh Shigemoto dkk pada tahun 2017 menyatakan bahwa sifat imunomodulator MSC berperan terhadap penyakit diabetes tipe 1 dengan menghambat proses inflamasi pada sel Langerhans dan meningkatkan kadar insulin plasma sehingga dapat menunda onset terjadinya diabetes.¹³ Penelitian lain yang dilakukan Liu dkk pada tahun 2019 menunjukkan bahwa MSC memberikan efek terapeutik terhadap penyakit *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) melalui efek anti inflamasi dan anti fibrotik disertai penghambatan proliferasi sel T sehingga dapat mengurangi peradangan paru dan perbaikan histologi paru.¹⁴ Penelitian Marvasti dkk juga mengungkapkan jika CD34⁺ berperan pengobatan infark miokard dengan menstimulasi angiogenesis untuk perbaikan jaringan sehingga dapat meningkatkan fungsi jantung.¹⁵ Berdasarkan penelitian-penelitian yang

telah dilakukan sebelumnya terdapat kesamaan bahwa MSC dan CD34⁺ terbukti memiliki efek terapi terhadap berbagai penyakit.

Interferon (IFN) merupakan salah satu sitokin proinflamasi MSC untuk menjaga imunitas tubuh.⁹ Interferon dapat mempengaruhi pertumbuhan dan diferensiasi CD34⁺.¹⁶ Interferon terbagi atas 3 jenis, yaitu IFN tipe I ($-\alpha$, $-\beta$, $-\kappa$, $-\epsilon$, $-\omega$, $-\tau$), tipe II ($-\gamma$) dan tipe III ($-\lambda 1-4$, $-\lambda 1-3$). IFN- γ berperan penting dalam respon imun karena dapat mempengaruhi semua aspek penting dimulai dari aktivasi sel fagositik, antara lain mengaktifkan makrofag dan menariknya ke tempat infeksi, menghasilkan oksida nitrat (NO) yang berperan penting dalam apoptosis makrofag, serta penginduksi dalam sel sintesis protein kompleks histokompatibilitas kelas kedua (MHC kelas II). Dengan demikian, IFN- γ merupakan regulator utama respon imun terhadap infeksi yang disebabkan oleh tuberkulosis.¹⁷

Terdapat beberapa kelemahan dalam pengobatan menggunakan sel punca, antara lain: kurangnya kemampuan viabilitas sel punca, kurangnya migrasi sel punca menuju area inflamasi, serta kurangnya *homing* di area inflamasi. *Coating* dengan lisat trombosit dan penggunaan mikroenkapsulasi dipikirkan sebagai cara untuk memperbaiki kelemahan tersebut. Lisat trombosit mengandung *growth factors*, sitokin, dan sistem regulator yang terlibat dalam sebagian besar fungsi sel dalam sistem endokrin, parakrin, autokrin, dan intrakrin.¹⁸ Sebuah penelitian terbaru menunjukkan bahwa MSC yang dikultur dengan lisat trombosit memiliki viabilitas yang tinggi.¹⁹ Mikroenkapsulasi didefinisikan sebagai teknik untuk melindungi padatan, cairan, dan gas dalam kapsul kecil yang melepaskan isinya dengan laju yang terkendali dalam jangka waktu yang lama.²⁰ Teknik mikroenkapsulasi memiliki potensi untuk meningkatkan fungsi imunomodulator dari MSC.²¹

Belum ada penelitian yang mengukur kadar IFN- γ pada kultur MSC dan CD34⁺ dengan mikroenkapsulasi dan lisat trombosit. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dengan tujuan untuk

mengetahui kadar IFN- γ untuk sediaan mikroenkapsulasi MSC dan CD34⁺ dengan *coating* guna menghasilkan terapi seluler MDR-TB dengan tingkat keberhasilan tinggi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan permasalahan di atas, maka yang menjadi pertanyaan dalam penelitian adalah berapakah rerata kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi MSC dan CD34⁺ dengan *coating* lisat trombosit?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengetahui rerata kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi MSC dan CD34⁺ dengan *coating* lisat trombosit.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat :

1.4.1. Bagi Institusi Pendidikan

Menambah referensi penelitian mengenai kadar IFN- γ dalam mikroenkapsulasi MSC-CD34⁺ dengan *coating* untuk terapi seluler MDR TB di Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen.

1.4.2. Bagi Peneliti

Menambah wawasan peneliti mengenai kadar IFN- γ dalam mikroenkapsulasi MSC-CD34⁺ dengan *coating* untuk terapi seluler MDR-TB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR – TB)

2.1.1. Definisi MDR-TB

Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) adalah keadaan tubuh pasien penderita tuberkulosis resisten terhadap setidaknya 2 jenis OAT yaitu rifampisin dan isoniazid yang merupakan obat penting yang digunakan dalam pengobatan penyakit tuberkulosis.¹ MDR-TB terjadi karena pasien resisten dengan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) yang disebabkan oleh mutasi spontan pada kromosom bakteri yang telah mengalami mutasi.²²

Kejadian resistensi pasien digolongkan menjadi resistensi pasien baru dan resistensi pasien lama. Resistensi pada pasien baru disebabkan pasien yang didiagnosa menderita tuberkulosis tidak pernah menerima pengobatan atau hanya mengonsumsi OAT < 1 bulan. Resistensi pada pasien lama atau pasien yang telah menerima pengobatan tuberkulosis > 1 bulan disebabkan beberapa faktor seperti pasien mengalami gagal pengobatan, pasien kambuh, atau pasien kembali setelah putus berobat.²²

2.1.2 Epidemiologi MDR-TB

Kasus MDR-TB mengalami peningkatan pada tahun 2020-2021 disebabkan pandemi Covid-19. Pada tahun 2021 jumlah kasus MDR-TB ditemukan sekitar 450.000 kasus di seluruh dunia. Jumlah ini naik sebesar 3,1% dibandingkan tahun 2020 sebesar 437.000 kasus. Ditemukan sekitar 3,6% kasus baru MDR-TB dan ditemukan 18% kasus pasien yang telah menerima pengobatan tuberkulosis. Terdapat 161.746 orang penderita MDR-TB telah menerima pengobatan. Terdapat 3 negara dengan angka kasus MDR-TB terbanyak di dunia, yaitu India, negara federasi Rusia, serta Pakistan.²

Indonesia merupakan salah satu dari 10 negara dengan tingkat kejadian MDR-TB tertinggi di dunia.² Insiden MDR-TB di Indonesia pada tahun 2017 berjumlah 12.000 kasus. Terjadi peningkatan jumlah kasus pada tahun 2018 menjadi 24.000 kasus.^{4,5} Berdasarkan data rekam medis RSUP Haji Adam Malik Medan ditemukan jumlah kasus MDR-TB pada tahun 2019 sebanyak 385 kasus, pada tahun 2021 sebanyak 202 kasus dan pada tahun 2022 mengalami peningkatan sebanyak 492 kasus.⁶

2.1.3 Faktor Risiko MDR-TB

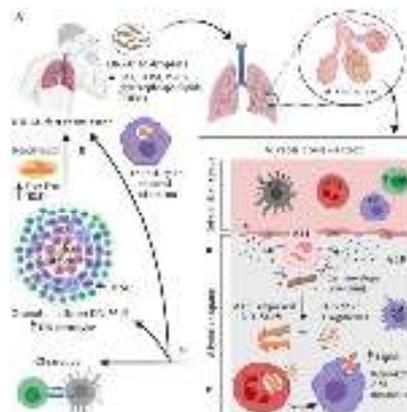
Faktor utama munculnya resistensi bakteri *M.tb* terhadap OAT adalah akibat pengobatan yang tidak tepat atau tidak sesuai standar pada pasien tuberkulosis. Secara umum, ada empat faktor risiko yang menyebabkan resistensi OAT yaitu faktor dokter, faktor pasien, faktor obat dan faktor sistem kesehatan. Faktor dokter meliputi diagnosis yang tidak tepat, pemberian obat yang tidak sesuai, serta kurangnya edukasi kepada pasien tuberkulosis. Faktor pasien meliputi ketidakpatuhan minum obat, tidak adanya Pengawas Minum Obat (PMO) serta kurangnya dukungan keluarga. Faktor obat meliputi dosis obat, jumlah obat, lama waktu pengobatan serta efek samping obat. Faktor sistem kesehatan meliputi jarak ke fasilitas pelayanan kesehatan yang jauh, kurangnya persediaan OAT hingga kualitas OAT yang rendah.²²

2.1.4 Patogenesis MDR – TB

M.tb telah berevolusi menjadi lebih efektif menginfeksi dan bertahan hidup pada inangnya serta lebih menular melalui udara. Bakteri ini ditularkan bila menghirup droplet yang mengandung *M.tb* yang resisten obat yang disebarkan melalui percikan batuk atau bersin penderita tuberkulosis. *M.tb* yang resisten obat mengandung konsentrasi asam lemak bebas (*free fatty acid*), *trehalose dimycolate* (TDM), glikolipid fenolik (PGLs), gliserofosfolipid serta lipid *Phthiocerol dimycocerosates* (PDIMs) yang meningkat. Bakteri kemudian akan melewati saluran

pernapasan atas dan mencapai alveoli. Alveoli adalah kantong udara yang terdiri sel epitel alveolar tipe 1 dan tipe 2 dan dikelilingi kapiler. Ruang alveolar mengandung makrofag alveolar sedangkan ruang interstisial terdapat makrofag interstisial (IM), sel dendritik, neutrofil (N) dan sel T.²³

M.tb yang resisten obat pertama kali berinteraksi dengan sistem imun yang berada pada *Alveolar Lavage Fluid* (ALF). Enzim hidrolase kemudian akan membelah dan memodifikasi bakteri sehingga fragmen *M.tb* dapat masuk ke dalam ruang alveolar. ALF yang telah terkontaminasi bakteri akan berinteraksi dengan makrofag alveolar dan sel imun. Fragmen bakteri ini akan memicu respon imun tubuh dan menarik neutrofil menuju daerah infeksi yang mendorong stress oksidatif dan peradangan. Makrofag alveolar akan ikut membantu menghadapi infeksi. Hal ini sukses mendorong terjadinya infeksi laten karena bakteri telah menetap di dalam granuloma yang menyediakan perlindungan terhadap obat tuberkulosis sehingga menyebabkan MDR-TB. Bakteri ini juga melepaskan asam lemak bebas dan membentuk matriks ekstraseluler guna melindungi bakteri terhadap obat tuberkulosis. Selanjutnya bakteri akan mengalami reaktivasi dan mengakibatkan kerusakan jaringan paru-paru dan membentuk kavitas.²³ Patogenesis MDR-TB dapat dilihat pada gambar 2.1 di bawah ini.



Gambar 2. 1 Patogenesis MDR-TB²³

2.1.5 Diagnosa MDR-TB

Untuk menangani pasien MDR-TB diperlukan diagnosa dengan metode yang akurat dan cepat. Pada tahun 2020 WHO merekomendasikan penggunaan Xpert MTB/RIF untuk mendiagnosa penyakit tuberkulosis paru, ekstra paru dan resistensi obat untuk orang dewasa dan anak-anak.²⁴ Xpert-MTB/RIF merupakan suatu metode uji laboratorium terbaru dengan bentuk cartridge atau paket menggunakan reagensia untuk mendiagnosa MDR-TB melalui amplifikasi asam nukleat. Pemeriksaan ini menggunakan prinsip PCR *real-time* untuk mendeteksi M.tb dan resistensi rifampisin dalam waktu dua jam.²⁵

Pemeriksaan Xpert-MTB/RIF menggunakan tiga primer spesifik untuk amplifikasi asam nukleat pada gen *rpoB*, serta menggunakan lima pelacak DNA untuk deteksi mutasi genetik. Pengambilan bahan pemeriksaan ini dapat berupa dahak langsung atau menggunakan hasil endapan dahak konsentrat.²⁵ Uji ini memberikan akurasi deteksi M.tb sebesar 98,2% pada pasien dengan hasil pemeriksaan BTA dan kultur positif sedangkan pada pasien dengan hasil pemeriksaan BTA negatif dan kultur positif adalah 72.5%.²⁴

2.1.6 Tatalaksana MDR – TB

WHO mengelompokkan regimen pengobatan untuk MDR-TB menjadi empat bagian, yaitu grup A, B, C dan D.²⁶ Tabel 2.1 menunjukkan jenis-jenis dan dosis obat MDR-TB berdasarkan kelompok regimen pengobatan.

Tabel 2. 1 Jenis Obat MDR-TB

Kelas	Obat	Singkatan	Dosis
WHO			
Grup A	Bedaquilline	BDQ	400 mg p.o sekali sehari selama 2 minggu, diikuti 200 mg p.o tiga kali seminggu

	Linezolid	LZD	1200 mg sekali sehari atau 600 mg p.o/iv dua kali sehari
	Levofloxacin	LFX	750 mg p.o/iv sekali sehari
	Moksifloxacin	MXF	400 mg p.o sekali sehari
Grup B	Klofazimin	CFZ	100 mg p.o sekali sehari
	Cycloserine / Terizidone	CYS / TRZ	10-15 mg/kg p.o dalam satu atau dua dosis setiap hari (maksimal 1000 mg/hari)
Grup C	Delamanid	DLM	> 50 kg: 100 mg p.o dua kali sehari 30-50 kg: 50 mg p.o dua kali sehari
	Amikacin	AMK	15 – 20 mg/kg iv/im sekali sehari
	Ethionamide / Prothionamide	ETH / PTH	15 – 20 mg/kg p.o dalam dua atau tiga dosis setiap hari (maksimal 1000 mg/hari)
Lainnya	Kanamycin	KAN	15 – 20 mg/kg iv/im sekali sehari
	Capreomycin	CAP	15 – 20 mg/kg iv/im sekali sehari
	Pretomanide	PTM	200 mg sekali sehari
	Tedizolid	TZD	200 p.o/iv setiap hari

Selain pengobatan menggunakan OAT, terdapat pengobatan suportif untuk pasien MDR-TB yang bertujuan untuk meningkatkan daya tahan tubuh dan mengobati keluhan tambahan pasien. Hal ini dapat dilakukan dengan pemberian makanan dalam porsi kecil sebanyak enam kali sehari termasuk buah dan sayuran. Makanan yang dikonsumsi harus mengandung gizi yang cukup, menggunakan bahan makanan seperti gula, minyak nabati dan mentega kacang, susu, telur dan bubuk susu kering

untuk membuat makanan dan minuman. Jamur, kentang, pisang, dan terigu merupakan sumber vitamin B6. Minum minuman tinggi kalori dan tinggi protein untuk membantu mencukupi kebutuhan kalori dan protein, minum 500-750 ml susu atau yoghurt setiap hari untuk mencukupi kebutuhan vitamin D dan kalsium serta minum air putih minimal 6-8 gelas setiap hari. Pasien tidak diperbolehkan mengonsumsi alkohol.²⁷

2.2. Sel Punca (*Stem Cell*)

Sel punca atau *stem cell* adalah sel yang tidak terspesialisasi yang memiliki 2 sifat utama, yaitu dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel lain serta mampu meregenerasi diri sendiri, Sel punca memiliki banyak manfaat dalam dunia kedokteran, antara lain terapi penyakit kardiovaskular seperti infark miokard, meningkatkan hasil transplantasi sumsum tulang, terapi penyakit degeneratif seperti stroke dan diabetes serta regenerasi jaringan ikat.²⁸

Sel punca terbagi menjadi 4 berdasarkan asalnya, yaitu sel punca embrionik, sel punca fetal, sel punca ekstra embrional dan sel punca dewasa. Sel punca dewasa digolongkan lagi berdasarkan asal jaringannya menjadi sel punca mesenkimal, sel punca hematopoietik, sel punca jantung, sel punca kulit, dan lain – lain.²⁸

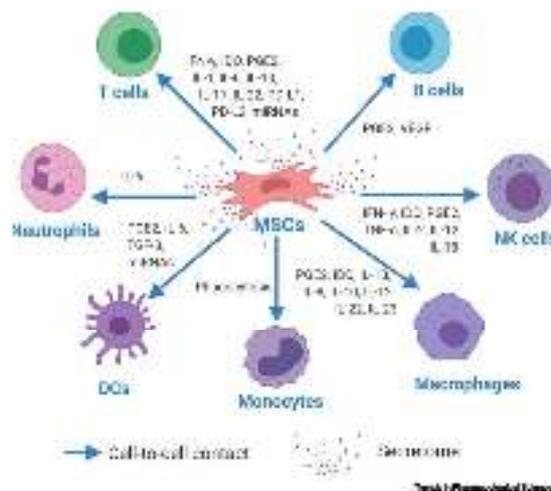
Sel punca yang diisolasi harus memiliki sterilitas tinggi guna mencegah penyakit menular yang dapat menyebabkan sepsis. Sampel diperoleh melalui *sectio caesarea*. Persalinan secara *sectio caesarea* mempunyai risiko terkontaminasi bakteri yang lebih rendah sebesar 1,5% daripada persalinan vaginal sebesar 8,4%. Kontaminasi dari vagina dan perianal serta bakteri dari kulit merupakan penyebab utama tingginya angka kontaminasi bakteri pada sel punca.²⁹

2.3. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC)

Mesenchymal Stem Cell (MSC) merupakan jenis sel punca dewasa yang bersifat multipoten, non-hematopoietik, mempunyai kemampuan

untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel seperti osteoblas, kondrosit, adiposit, serta berbagai jenis sel endotel, hingga kardiovaskuler dan neurologi MSC dapat diisolasi dari berbagai jaringan tubuh, seperti dari sumsum tulang belakang, tali pusat, plasenta, atau dari jaringan lemak dengan cara *ex vivo*.^{30,31} MSC berperan penting dalam perbaikan jaringan tubuh. MSC dapat merangsang proses neoangiogenesis, bersifat immunosupresi, anti inflamasi, anti tumorigenik, anti fibrotik, serta anti apoptosis.^{9,31} Oleh karena itu sel punca ini mempunyai potensi terapi untuk pengobatan regeneratif, gangguan inflamasi hingga pengobatan kanker.³¹ Terapi dengan MSC telah banyak digunakan dalam berbagai penyakit, termasuk penyakit autoimun seperti lupus, infark miokard, luka bakar, stroke, hingga kanker.^{9,31}

MSC ikut berpartisipasi dalam sistem imunitas tubuh melalui fungsi imunomodulasi dengan cara komunikasi antar sel imun dan aktivitas parakrin yang terdiri dari sel T, sel B, sel NK, makrofag, monosit, sel dendritik, serta neutrofil. Berikut beberapa sekretom yang dihasilkan MSC yang dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2. 2 Interaksi MSC dengan Sel Imun³¹

Aktivitas parakrin MSC terbukti memiliki dampak positif dalam pengobatan melalui sekretom yang dihasilkan MSC. Sekretom merupakan kumpulan molekul (kemokin, sitokin, *growth factors*) yang disekresikan

ke ruang ekstraseluler. Sekretom akan terlibat dalam keberlangsungan hidup sel, proses, proses proliferasi, proses angiogenesis serta sistem imun tubuh. Berbagai hasil sekresi MSC antara lain *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Insulin-like Growth Factor* (IGF)-1, bFGF, (TGF- β 1), *Nerve Growth Factor* (NGF), *Placental Growth Factors* (PGF), *Stromal-derived Growth Factor* (SDF-1/CXCL12), *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1/CCL2), IL-6, IL-8, IL-10, dan IL-13. MSC akan menghasilkan sekretom yang berbeda-beda tergantung dari asal MSC.³⁰

Fungsi imunomodulator dan regeneratif MSC diatur oleh mekanisme pensinyalan parakrin yang disebut dengan sekretom. Sekretom yang disekresikan MSC memiliki fungsi yang sangat serbaguna dan konsentrasinya dapat dimanipulasi sesuai kebutuhan klinis sehingga memiliki potensi terapeutik. Beberapa fungsi utama sekretom MSC antara lain anti inflamasi, angiogenik, dan imunomodulator. Aktivitas parakrin ini menghasilkan sekretom seperti Interferon Gamma (IFN- γ) yang berperan dalam pro inflamasi, Prostaglandin E₂ yang berperan dalam imunomodulator, dan Interleukin 8 (IL-10) yang berperan dalam angiogenesis.³²

Sekretom MSC diketahui berperan mengobati penyakit MDR-TB dengan menghasilkan faktor anti mikroba. Faktor ini berfungsi menyingkirkan M.tb dari daerah infeksi dengan sekresi imunomodulator TGF- α , TNF- β , PGE₂, serta peptida anti mikroba LL-37 melalui kontak antar sel secara independen dan dependen. Respon antibakteri oleh MSC ini ditunjukkan melalui respon anti inflamasi dengan sekresi IL-17, TNF- α dan IFN- γ . MSC menghambat aktivitas M.tb dengan produksi nitrogen oksida (NO) dengan interaksi sel T. MSC juga memfagosit M.tb dengan melakukan diferensiasi monosit menjadi makrofag serta meningkatkan aktivitas bakterisidal makrofag. MSC dapat memulihkan epitel paru-paru yang rusak dan meningkatkan proliferasi sel alevolar.⁹

2.4. CD34⁺

CD34⁺ merupakan salah satu protein penanda permukaan yang umum dari sel punca hematopoietik. *Hematopoietic Stem Cell* (HSC) merupakan sel punca yang bersifat multipoten dan menghasilkan eritrosit, leukosit, dan trombosit.³³ CD34⁺ merupakan transmembran sialomusin yang terdiri dari antigen *haematopoietic progenitor cells* (HPC), *endothelial cells* (EC) dan *endothelial progenitor cells* (EPC).³⁴ Sumber utama CD34⁺ pada manusia adalah dari sumsum tulang dan darah tepi, terutama darah tali pusat.¹⁵

CD34⁺ memiliki potensi dalam diferensiasi, migrasi, dan adhesi sel. CD34⁺ memiliki kemampuan proliferasi dan regenerasi yang tinggi sehingga dapat digunakan dalam terapi seluler, rekonstruksi hematopoietik serta terapi regeneratif.¹⁵ CD34⁺ merupakan sel progenitor untuk vaskulogenesis, memiliki fungsi parakrin untuk angiogenesis dan anti inflamasi, memiliki potensi untuk diferensiasi menjadi sel endotel dan memiliki efek terapi pada penyakit iskemik dan inflamasi.³⁴

Aktivitas parakrin CD34⁺ berperan penting dalam proses angiogenesis, anti inflamasi, imunomodulator, dan anti apoptosis serta mendorong perkembangan mikrovaskular.³⁴ CD34⁺ merupakan pemimpin proses angiogenesis dan anti inflamasi dalam tubuh. Sel CD34⁺ dapat mensekresikan beberapa sitokin angiogenik antara lain, interleukin 8 (IL-8), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Cytokine-Like 1* (CYTL1), *Hepatic Growth Factor* (HGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Angiopoietin-1*, *Platelet-Delivered Growth Factor* (PDGF) dan *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF).^{34,35} Turunan sel punca hematopoietik diketahui mengekspresikan sitokin proinflamasi seperti TGF- β , IL-10, IFN- γ , IL-4, PGE2, M-CSF, G-CSF dan adenosin.³⁴

CD34⁺ menunjukkan efek terapeutik pada organ paru-paru yang terinfeksi seperti pada penyakit MDR-TB. CD34⁺ terbukti dapat menurunkan proses inflamasi dengan sifat anti inflamasinya.³⁴ CD34⁺ asal darah tali pusat akan mendorong plastisitas dan imunomodulator MSC.³⁶

2.5. Mikroenkapsulasi dengan *Coating*

Mikroenkapsulasi didefinisikan sebagai teknik untuk melindungi padatan, cairan, dan gas dalam kapsul kecil yang melepaskan isinya dengan laju yang terkendali dalam jangka waktu yang lama. Teknik mikroenkapsulasi berguna untuk mencegah terjadinya kerusakan senyawa dan meningkatkan bioavailabilitas senyawa. Teknik ini mempunyai kelebihan antara lain dapat meningkatkan usia penyimpanan produk, mengurangi potensi penguapan, pembusukan dan reaksi antar senyawa mengontrol pelepasan senyawa aktif dalam obat.²⁰

MSC yang dienkapsulasi akan mengalami peningkatan fungsi imunomodulator dengan waktu persistensi yang lebih lama.²¹ Teknik mikroenkapsulasi pada MSC terbukti memiliki viabilitas yang tinggi. Sistem mikroenkapsulasi CD34⁺ dapat memfasilitasi ekspresi parakrin CD34⁺. Lapisan mikroenkapsulasi dapat melindungi CD34⁺ dari intrusi sel imun tubuh dan bersifat permeabel sehingga memungkinkan terjadinya pertukaran nutrisi dan sekresi parakrin. Teknik mikroenkapsulasi ini tidak mengurangi viabilitas sel serta tidak menimbulkan efek sitotoksik terhadap CD34⁺.³³

Lisat trombosit merupakan suspensi trombosit yang berasal dari darah utuh dari individu yang sama (autologus) yang mengandung konsentrasi trombosit 2 sampai 3 kali di atas rata-rata. Lisat trombosit mengandung *growth factors*, sitokin, kemokin, serta *Cell-Adhesion Molecules* (CAM) yang berperan dalam proses penyembuhan luka, proliferasi, serta regenerasi jaringan. Pengobatan sel punca yang dikombinasikan dengan lisat trombosit dapat meningkatkan penyembuhan luka. Kombinasi pengobatan ini dapat membantu modulasi peradangan, meningkatkan deposisi kolagen, angiogenesis dan neurogenesis.³⁷

Lisat trombosit diperoleh dari sampel darah orang sehat dengan metode *Platelet Rich Plasma* (PRP) atau dengan metode *buffy coat*. Pada metode PRP, *whole blood* atau darah utuh dimasukkan ke dalam tabung

yang berisi antikoagulan kemudian dilakukan dua kali sentrifugasi untuk memisahkan dengan eritrosit serta untuk mendapatkan konsentrat PRP yang murni. Pada metode *buffy coat, whole blood* akan disentrifugasi dengan kecepatan tinggi dengan *buffy coat* yang lain kemudian dipisahkan dengan kandungan leukosit.³⁸

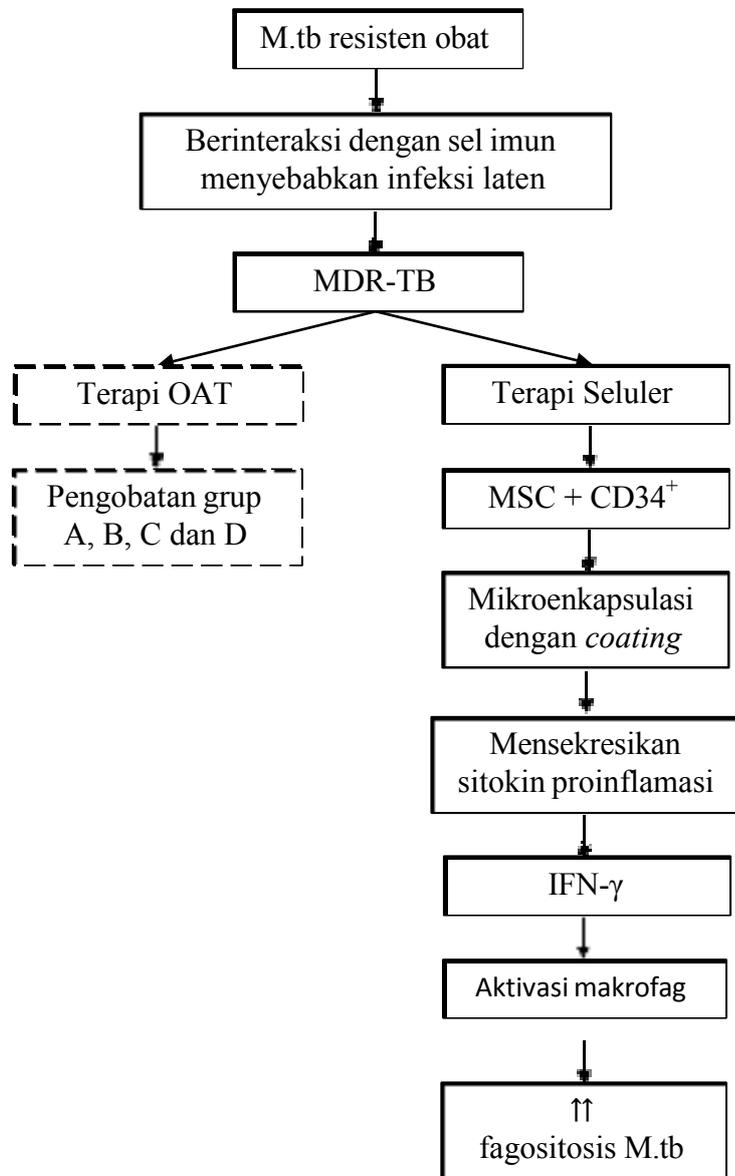
2.6. Interferon Gamma (IFN- γ)

Interferon merupakan salah satu sitokin yang dihasilkan oleh sel imun tubuh. Interferon terbagi menjadi 2 tipe, yaitu tipe I yang terdiri atas IFN- α , IFN- β , IFN- ω , dan IFN- τ sedangkan tipe II hanya IFN- γ . IFN- γ dihasilkan oleh sel T, sel natural killer (NK), sel natural killer T (NKT), serta Antigen Presenting Cell (APC) antara lain monosit, makrofag, serta sel dendrit.³⁹ Sumber produksi IFN- γ utama yaitu sel NK dan sel NKT sedangkan sel T CD8+ dan CD4+ merupakan sumber parakrin IFN- γ .⁴⁰

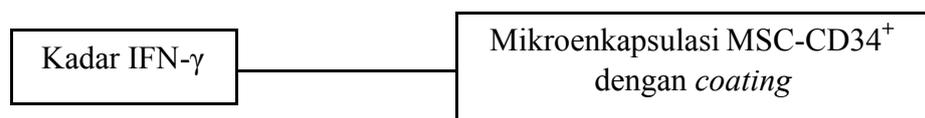
IFN- γ merupakan sitokin pleiotropik yang berguna sebagai antivirus, antitumor, dan imunomodulator. IFN- γ memegang peran yang penting dalam respon imun karena dapat memicu aktivasi respon imun bawaan dan merangsang eliminasi patogen.⁴⁰ Aktivitas IFN- γ diperantari oleh reseptor *Toll Like Receptor* (TLR).⁴¹ TLR merupakan reseptor yang dapat mengatur aktivasi respon imun dan respon inflamasi khususnya sitokin proinflamasi.⁴² *Interferon Gamma Release Assay* (IGRA) merupakan pemeriksaan laboratorium untuk mengukur kadar IFN- γ . IGRA terbagi atas 2, yaitu pemeriksaan ELISA yang merupakan *gold standar* pemeriksaan kuantitas protein serta dapat mengukur kadar IFN- γ dan uji ELISPOT yang dapat mengukur jumlah sel T yang menghasilkan IFN- γ .³⁹

Fungsi imunomodulator dari IFN- γ dapat mengatasi resistensi obat pada penderita MDR-TB. IFN- γ mampu meningkatkan resistensi sel terhadap bakteri M.tb serta menyebarkan sinyal parakrin sel. Sitokin ini juga dapat meningkatkan aktivitas makrofag melawan M.tb serta meningkatkan efek terapi dari makrofag terhadap pasien.¹⁷

2.7. Kerangka Teori



2.8. Kerangka Konsep



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional dengan tahapan sebagai berikut :

1. Isolasi Sel Punca Hematopoietik CD34⁺
2. Kapsulasi sel punca hematopoietik CD34⁺
3. Kultur MSC dan sel punca hematopoietik CD34⁺
4. Uji kadar IFN- γ dengan pemeriksaan ELISA

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian direncanakan akan dilakukan di Pusat penelitian Stem Cell and Tissue Engineering (SCTE) yang dikelola Indonesian Medical Education and Research Institute (IMERI) Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia 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⁺
2. Tahap II September – Oktober 2023: Uji kadar IFN- γ 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

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
1	<i>Cap</i>	Aseptik	1 boks
2	<i>Freezing container</i>	Cryo	1
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	IFN- γ Kit Elisa	ELISA	1 buah

3.4. Cara Kerja

3.4.1 Isolasi Sel Punca Hematopoietik CD34⁺

Sel punca hematopoietik CD34⁺ 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⁺ 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⁺ dianalisa dengan menggunakan flowsitometer.

3.4.2 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 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% 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*.

3.4.3 Mikroenkapsulasi MSC dan Sel Punca Hematopoietik CD34⁺

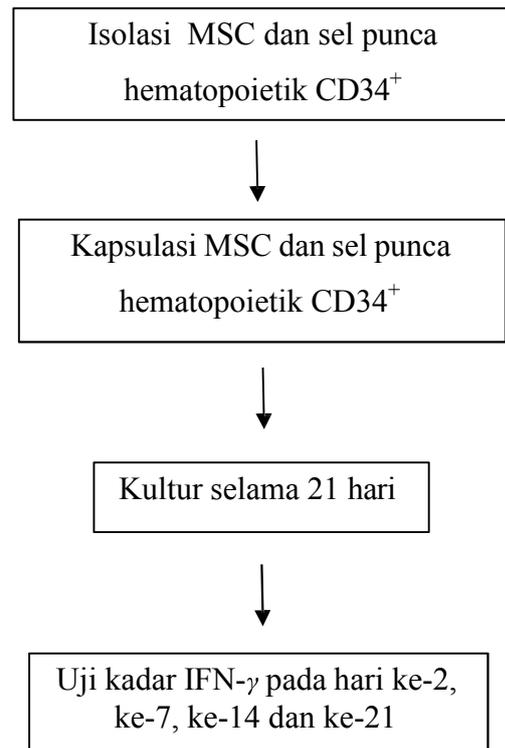
Suspensi 1.600.000 MSC dalam 0,5 ml medium kultur MSC dan suspensi 800.000 sel punca hematopoietik dalam 0,25 ml medium kultur CD34⁺, dicampur dalam tabung 1,5 ml. Total larutan sel adalah 0,75 ml dengan jumlah 12.000.000 sel punca. 3 ml larutan alginat 1,8% dicampurkan dengan 0.75 ml larutan yang berisi 12.000.000 sel punca. Larutan alginat 1,8% dan suspensi sel diteteskan ke dalam CaCl 0,2M dengan menggunakan spuit insulin. Kemudian dilakukan *coating* lisat konsentrat trombosit: 200 mikro kapsul disuspensikan ke dalam 2 ml 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⁺ dikultur dalam medium kultur MSC selama 21 hari.

3.4.4 Uji Kadar IFN- γ

Kadar IFN- γ diukur dengan menggunakan medium kultur mikroenkapsulasi. Analisa dilakukan pada 48 jam, hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21. Kit untuk mengukur kadar albumin menggunakan IFN- γ ELISA Kit sesuai dengan petunjuk dari produsen. Sinyal absorbansi

diukur dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 260nm dan 280 nm.

3.4.5 Prosedur Penelitian



3.4.6 Analisa Data

Data berupa hasil absorbansi spektrofotometer dianalisis menggunakan program Excel untuk mengetahui kadar IFN- γ pada mikroenkapsulasi MSC-CD34⁺ dengan *coating*.

