

**LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN HASIL PENELITIAN**

**Judul : Kadar IFN- γ Mikroenkapsulasi MSC-CD34 : Studi Preliminar
Terapi MDR- TB**

Nama : Anugrah Ekardin Gen

NPM : 20000059

Dosen Pembimbing I



(dr. Evyina J. Silunggang, M. Biomed)

Dosen Pembimbing II



(dr. Sufida, PA)

Dosen Penguji



(dr. Rudyn R. Panjaitan, M.Ked (KK), SpKK)

**Ketua Program
Studi Sarjana Kedokteran**



(dr. Ade Pryta Simaremare, M.Biomed)

**Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas HKBP Nommensen**



(Dr.dr. Leo J. Simanjuntak, Sp.O)

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Menurut WHO, *Multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB) adalah infeksi tuberkulosis yang tahan terhadap pengobatan standar dengan isoniazid dan rifampisin.¹ Masalah MDR-TB terus menjadi krisis kesehatan masyarakat dan menjadi ancaman serius terhadap keamanan kesehatan. Pada tahun 2021, hanya sekitar sepertiga dari pasien tuberkulosis yang resisten terhadap obat bisa mendapatkan pengobatan.¹ Peningkatan jumlah kasus MDR-TB di Indonesia menjadi signifikan, mencapai 28.000 kasus. Di Provinsi Sumatera Utara, tercatat adanya 1.838 kasus MDR-TB pada tahun 2021.²

MDR-TB bisa disembuhkan dengan menggunakan obat antituberkulosis lini kedua.³ Mengelola pasien MDR-TB memerlukan perhatian khusus karena kompleksitasnya, termasuk biaya pengujian rutin setiap minggu, efek samping pengobatan, dan durasi pengobatan yang panjang. Oleh karena itu, diperlukan solusi alternatif untuk mengatasi tantangan ini.⁴

Terapi menggunakan sel punca telah banyak dikembangkan. Sel punca memiliki kemampuan untuk proliferasi, dan diferensiasi. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dan *Hematopoietic Stem Cell* CD34 (HSC) berfungsi di lokasi jaringan yang cedera untuk menyebabkan jaringan beregenerasi.

Mesenchymal Stem Cell (MSC) adalah sel multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dan memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri. Selain itu, mereka juga dikenal memiliki sifat imunomodulator, yang berarti mereka dapat memengaruhi respons sistem kekebalan tubuh.⁵ MSC mampu berpindah ke lokasi peradangan, jaringan yang terluka, area infeksi, dan tumor, di mana mereka mempengaruhi

lingkungan mikro melalui kontak langsung dan pelepasan faktor-faktor yang larut sehingga memfasilitasi penyembuhan jaringan yang rusak. Mereka juga merespons terhadap kemokin, sitokin, dan faktor pertumbuhan.⁶ *Hematopoietic Stem Cell* CD34 (HSC CD34), di sisi lain, adalah sel punca dewasa yang memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi sel-sel darah.⁷

Protein transmembran *Cluster of Differentiation* (CD34) pertama kali ditemukan pada sel punca hematopoietik dan progenitor.⁸ CD34 berperan dalam mengatur migrasi berbagai jenis sel imun ke area peradangan dan berinteraksi dengan berbagai molekul adhesi.⁹

Penelitian tentang penggunaan sel punca dalam pengobatan TB berkaitan dengan kemampuan sel punca untuk mengeluarkan zat-zat yang dapat membantu dalam eliminasi bakteri TB melalui efek parakrin. MSC dapat mengeluarkan berbagai sitokin, antiinflamasi, dan interferon- γ (IFN- γ). IFN- γ memiliki peran penting dalam proses eliminasi bakteri TB. Untuk meningkatkan kelangsungan hidup sel punca, dilakukan kapsulasi sel punca menggunakan alginat, dengan tujuan untuk menjaga agar sel punca tetap hidup dan mencapai organ yang menjadi sasaran pengobatan.

Karena itu, teknik mikroenkapsulasi dianggap sebagai solusi yang tepat. Mikroenkapsulasi merujuk pada proses di mana partikel kecil atau tetesan cairan dibungkus atau dilapisi oleh bahan polimer untuk membentuk partikel kecil yang disebut mikrokapsul atau mikrosfer.¹⁰ Tujuan dari proses mikroenkapsulasi adalah untuk meningkatkan stabilitas dan kelarutan serta mengontrol pelepasan zat senyawa aktif, dengan menghasilkan partikel padat yang dilapisi oleh bahan penyalut tertentu dan meminimalkan kehilangan nutrisi.¹⁰

Dasar dari penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi rerata kadar IFN- γ pada medium kultur MSC dan CD34 yang berasal dari tali pusat yang telah dienkapsulasi menggunakan kapsul berbasis alginat. Penelitian ini merupakan studi awal dalam mencari terapi alternatif untuk MDR-TB.

1.2. Rumusan Masalah

Berapakah kadar IFN- γ mikroenkapsulasi MSC-CD34 pada medium kultur mikroenkapsulasi MSC dan CD34 ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi MSC-CD34.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi MSC-CD34 pada hari pengamatan ke-2
2. Untuk mengetahui kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi MSC-CD34 pada hari pengamatan Ke-7
3. Untuk mengetahui kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi MSC-CD34 pada hari pengamatan Ke-14
4. Untuk mengetahui kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi MSC-CD34 pada hari pengamatan Ke-21

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Bagi Peneliti

Tujuan penelitian ini bagi peneliti adalah untuk meningkatkan pemahaman mengenai peran IFN- γ dalam medium kultur mikroenkapsulasi MSC-CD34 sebagai tahap awal dalam penyelidikan terapi seluler untuk MDR-TB.

1.4.2. Bagi Masyarakat

Bertujuan untuk meningkatkan kesadaran masyarakat mengenai opsi pengobatan alternatif untuk MDR-TB.

1.4.3. Bagi Institusi

Penelitian ini memberikan manfaat bagi institusi dengan memberikan landasan untuk penelitian selanjutnya tentang pemanfaatan MSC dan CD34 sebagai alternatif terapi untuk MDR-TB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Multi Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB)*

2.1.1. Definisi dan Epidemiologi MDR-TB

Tuberkulosis resistan obat dapat berupa MDR-TB yang disebabkan oleh resistensi bakteri terhadap minimal dua jenis obat anti tuberkulosis lini pertama yaitu rifampisin dan isoniazid.¹¹

Pertama kali, resistensi terhadap antibiotik diperhatikan ketika streptomisin (SM) diperkenalkan pada tahun 1945. Meskipun respons awal dari tes bakteriologis dan radiografi tampak baik, kejadian resistensi terhadap SM mulai terjadi pada pasien yang menjalani pengujian, dan penggunaan SM sebagai monoterapi tidak memberikan manfaat dalam jangka panjang untuk kelangsungan hidup. Saat ini, tuberkulosis yang tahan terhadap berbagai jenis obat diperkirakan terjadi pada 1 hingga 2 juta pasien setiap tahunnya.¹²

Pada tahun 2021, tercatat sebanyak 450.000 kasus MDR-TB di seluruh dunia.¹³ Indonesia berada di antara 30 negara dengan tingkat tuberkulosis multiresisten (MDR-TB) yang tinggi. Meskipun terjadi penurunan tren insidensi MDR-TB dari 26.000 kasus pada tahun 2015 menjadi 24.000 kasus pada tahun 2020, jumlah kasus MDR-TB meningkat menjadi 28.000 kasus pada tahun 2021, melebihi angka insidensi pada tahun 2015. MDR-TB menyebabkan sekitar 20% dari total kematian akibat tuberkulosis secara global, di mana tingkat kematian akibat tuberkulosis global mencapai 20 kasus per 100.000 penduduk. Pada tahun 2021, MDR-TB dilaporkan sebagai penyebab 191.000 kematian. Persentase kematian pasien tuberkulosis yang resisten terhadap obat, termasuk MDR-TB, meningkat di Indonesia. Pada tahun 2009, tingkat kematian akibat MDR-TB adalah 10,5%, meningkat menjadi 15,6% pada tahun 2013, dan mencapai 18,5% pada tahun 2017.¹³

Mycobacterium tuberculosis menyebabkan perkembangan strain yang resisten terhadap obat, yang mengakibatkan peningkatan jumlah basil

tuberkel yang memiliki resistensi ganda terhadap berbagai jenis obat.¹⁴ Di samping itu, sebagian besar kasus baru TB-MDR disebabkan oleh kesalahan dalam manajemen TB sebelumnya, termasuk pemberian regimen obat anti-tuberkulosis (OAT) yang tidak efektif atau monoterapi, dosis yang tidak tepat, instruksi dokter yang tidak jelas, kurangnya pengawasan menelan obat (PMO), dan kegagalan dalam mendeteksi resistensi yang sudah ada sebelumnya.¹⁵

2.1.2. Faktor risiko MDR-TB

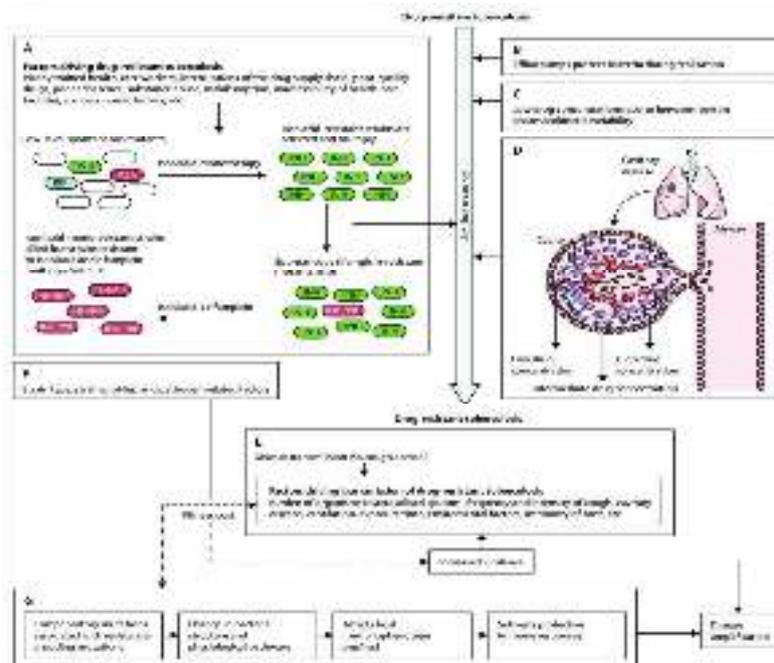
Faktor-faktor risiko yang dapat menyebabkan terjadinya MDR-TB meliputi kegagalan dalam merespons terhadap pengobatan menggunakan regimen DOTS lini pertama, pengalaman kekambuhan setelah menyelesaikan pengobatan dengan regimen lini pertama, pengobatan setelah terputus dari pengobatan dengan regimen lini pertama, paparan terhadap kasus MDR-TB yang diketahui, eksposur terhadap TB di institusi dengan tingkat prevalensi MDR-TB yang tinggi seperti penjara atau rumah sakit, tinggal di daerah atau negara dengan tingkat prevalensi MDR-TB yang tinggi, dan koinfeksi dengan HIV.¹⁵

2.1.3. Patogenesis MDR-TB

Patogenesis tuberkulosis yang tahan obat (Gambar 2.1.) melibatkan perkembangan resistensi obat yang berurutan melalui pengobatan yang terfragmentasi, yang dapat dipicu oleh berbagai faktor program dan sosial ekonomi. Meskipun kepatuhan pengobatan sangat baik, resistensi masih dapat berkembang. Beberapa faktor, termasuk efek pompa keluar (efflux pumps), variasi farmakokinetik antar individu, dan adanya imunopatologi yang luas di paru-paru, yang menghasilkan penetrasi obat yang berbeda ke dalam granuloma dan rongga, semuanya dapat mempengaruhi konsentrasi obat di lokasi spesifik di bawah batas konsentrasi penghambatan minimum, sehingga memungkinkan terjadinya resistensi obat. Setelah resistensi obat muncul, penularan dari individu ke individu dapat menjadi jalur utama penyebarannya. Faktor-faktor seperti genotipe strain spesifik, mutasi dalam kode gen obat yang baru muncul, dan mutasi kompensasi yang memengaruhi biaya kebugaran (dan, akibatnya, transmisi) juga dapat saling berinteraksi.

Mutasi kompensasi dapat dikaitkan dengan perubahan struktur dan jalur fisiologis, yang berpotensi memengaruhi respons imun inang dan, dengan demikian, dapat merusak respons protektif dan memicu perkembangan penyakit yang progresif.¹⁶

Sistem kekebalan berperan sebagai target pasif xenobiotik yang meredam, dan paparan terhadap xenobiotik dapat meningkatkan insiden penyakit menular atau neoplasia karena ketidakmampuan inang untuk merespons. Respon sistem kekebalan terhadap xenobiotik lainnya dapat menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam respons imun spesifik, yang pada gilirannya dapat menghasilkan konsekuensi kesehatan yang merugikan, seperti alergi saluran pernafasan, dermatitis kontak alergi, atau perkembangan penyakit autoimun.¹⁷



Gambar 2.1. Patogenesis MDR-TB.¹⁶

TB, yang disebabkan oleh patogen *Mycobacterium tuberculosis*, merupakan salah satu penyakit mematikan terkemuka di dunia yang disebabkan oleh satu agen infeksi. Setelah terhirup, *Mycobacterium tuberculosis* mencapai ruang alveolar dan terendap di dalam cairan yang melapisi alveoli (ALF), di mana ia berinteraksi secara dekat dengan

komponen larut dari mukosa paru sebelum berkontak dengan kompartemen seluler, seperti makrofag alveolar (AM) dan sel imun lainnya.¹⁸

Biasanya, resistensi obat pada *M.tb* dianggap terjadi karena mutasi kromosom tunggal. Namun, saat ini terdapat bukti yang menunjukkan bahwa untuk beberapa obat anti-TB, resistensi obat yang terjadi sebenarnya merupakan hasil dari serangkaian perubahan bertahap dan fiksasi mutasi yang menyebabkan peningkatan resistensi secara bertahap. Proses ini dimulai dengan perkembangan resistensi terhadap isoniazid, yang kemudian diikuti dengan peningkatan resistensi terhadap rifampisin atau etambutol.¹⁸

2.1.4. Penegakan diagnosis MDR-TB

Dalam penegakan diagnosis MDR TB dapat dilakukan dengan memanfaatkan deteksi mutasi dari DNA. Pemeriksaan dalam menegakkan MDR TB yaitu :

a. Xpert MTB/RIF

Penggunaan uji molekuler cepat telah menjadi bagian dari proses diagnosis tuberkulosis resisten obat. Metode seperti Xpert MTB/RIF menggunakan cartridge atau reagen untuk mengamplifikasi asam nukleat DNA dalam laboratorium. Uji ini telah terbukti menjadi metode yang cepat dan akurat dalam memeriksa sampel dahak untuk mendeteksi MDR TB, bahkan lebih baik daripada pemeriksaan mikroskopis langsung untuk basil tuberkulosis asam-alami (BTA). Sensitivitas yang kurang optimal sering dikaitkan dengan kadar bakteri yang rendah dalam sampel dahak, yang mungkin berada di bawah ambang batas deteksi oleh Xpert MTB/Rif.¹⁹

b. Uji Line Probe Assay (LPAs)

Metode ini melibatkan ekstraksi DNA dari sampel dahak, di mana DNA yang telah diamplifikasi kemudian disatukan dengan probe melalui proses hibridisasi. Ketika DNA dan probe saling berikatan, akan terbentuk pita yang dapat dideteksi secara visual melalui perubahan warna.²⁰

2.2. Pengobatan MDR-TB

Penderita MDR-TB memerlukan pengawasan dan pengobatan yang cermat untuk mencegah penularan kepada orang lain. Pengobatan MDR-TB diberikan menurut durasi pengobatan yang terdiri dari :

a. Regimen pengobatan pendek

Pengobatan MDR-TB dalam regimen pendek mencakup dua opsi: regimen selama enam bulan dan regimen selama sembilan bulan. Regimen enam bulan melibatkan penggunaan bedaquiline, pretomanid, linezolid, dan clofazimine selama enam bulan, sementara regimen sembilan bulan mencakup bedaquiline, levofloxacin, ethionamide, isoniazid, pyrazinamide, dan clofazimine.

Menurut rekomendasi WHO, penggunaan regimen pendek disarankan untuk pasien MDR-TB atau TB pre-XDR yang memenuhi syarat-syarat berikut: menderita tuberkulosis paru atau ekstrapulmonal kecuali pada kasus keterlibatan sistem saraf pusat, osteoartikular, dan millier; berusia 14 tahun atau lebih; tanpa memandang status HIV; belum terpapar bedaquiline, linezolid, pretomanid, atau delamanid selama kurang dari satu bulan; atau telah terpapar bedaquiline, linezolid, pretomanid, atau delamanid selama lebih dari satu bulan dengan hasil uji resistensi yang menunjukkan ketidakmampuan resistensi terhadap obat-obatan tersebut.²¹

b. Regimen pengobatan panjang

Dalam pengobatan MDR-TB, regimen yang panjang melibatkan pengelompokan obat ke dalam tiga grup: grup A, grup B, dan grup C. Semua regimen dapat direkomendasikan untuk penderita HIV dengan pengawasan khusus pada penderita yang memiliki kadar CD4+ di bawah < 100/mm³. Agen dalam grup A dianggap sebagai pilihan utama yang sangat efektif dalam regimen MDR-TB, kecuali jika terdapat kontraindikasi. Grup B direkomendasikan secara kondisional sebagai pilihan kedua. Obat-obat dari grup C dapat dipertimbangkan jika tidak memungkinkan untuk merumuskan regimen yang memadai menggunakan obat dari grup A atau grup B. Pemilihan obat dalam grup C didasarkan pada keseimbangan antara manfaat dan toksisitasnya, dan mencakup semua obat lain kecuali isoniazid dosis tinggi, amoksisilin-klavulanat, kanamisin, dan kapreomisin.²¹ Regimen panjang direkomendasikan untuk pasien MDR-TB yang memenuhi kriteria-kriteria berikut: pasien yang tidak merespon terhadap pengobatan dengan regimen jangka pendek; pasien yang diduga atau telah terkonfirmasi

memiliki resistensi terhadap bedaquiline, clofazimine, atau linezolid; pasien dengan tuberkulosis paru yang menunjukkan lesi luas dan kavitas pada kedua lapangan paru; serta pasien MDR-TB ekstrapulmonal yang mengalami kondisi yang berat atau memiliki komplikasi seperti tuberkulosis meningitis, TB tulang, TB spondilitis, TB milier, TB perikarditis, atau TB abdomen.²²

2.3. Sel Punca

Sel punca, atau yang juga dikenal sebagai sel induk, adalah sel prekursor yang memiliki kemampuan untuk berkembang menjadi sel dengan fungsi spesifik dalam berbagai jenis jaringan tubuh. Salah satu karakteristik utama dari sel punca adalah kemampuannya untuk memperbarui dirinya sendiri melalui proliferasi yang ekstensif, sambil tetap mempertahankan kemampuan untuk berubah menjadi jenis sel yang berbeda.²²

2.3.1. Mesenchymal Stem Cell

Sel punca mesenkimal (MSC) salah satu sel punca dewasa yang memiliki sifat multipotent dan dapat ditemukan dalam berbagai jaringan tubuh seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat. MSC memiliki kemampuan untuk mengalami diferensiasi menjadi berbagai jenis sel, termasuk sel tulang, tulang rawan, dan sel lemak. Di samping itu, MSC juga memiliki sifat imunomodulator yang menjadikannya sebagai kandidat yang menjanjikan dalam pengobatan regeneratif dan imunoterapi.

MSC yang berasal dari tali pusat memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan yang diperoleh dari sumber lainnya. MSC yang diperoleh dari tali pusat lebih mudah didapatkan dan memiliki tingkat proliferasi yang lebih tinggi daripada yang berasal dari sumber lain. Selain itu, MSC dari tali pusat memiliki risiko penularan infeksi yang lebih rendah. Telah terbukti bahwa MSC dari tali pusat memiliki tingkat imunomodulasi yang tinggi.²²

MSC tidak secara langsung berinteraksi dengan jaringan atau sel yang rusak; sebaliknya, mereka memberikan sinyal kepada sel progenitor tertentu untuk memperbaharui jaringan yang rusak. The International Society for Cellular Therapy untuk memverifikasi identitas MSC menggunakan CD70,

CD90, dan CD105 sebagai penanda positif, sementara CD34 digunakan sebagai penanda negatif.²³

2.3.2. Hematopoietic Stem Cell

Hematopoietic Stem Cell (HSC), atau sel punca hematopoietik, merupakan sel prekursor multipoten yang memiliki kemampuan unik untuk memperbaharui diri menjadi berbagai jenis sel dan beregenerasi sendiri untuk melanjutkan proliferasi dalam sistem pembentuk darah disebut sel punca hematopoietik. Sel-sel ini pertama kali ditemukan di sumsum tulang, dan telah terbukti memiliki peran penting dalam produksi sel darah yang normal dalam tubuh manusia.²⁴ HSC CD34 menunjukkan bahwa sel-sel dari darah tali pusat manusia memiliki kemampuan untuk memperbaharui sistem kekebalan tubuh dalam kasus-kasus yang parah seperti imunodefisiensi gabungan.⁷ Beberapa studi menunjukkan bahwa IFN dapat memiliki efek positif terhadap HSC. IFN dapat meningkatkan kemampuan regeneratif HSC.²⁵

2.4. Interferon-gamma (IFN- γ)

IFN- γ , sebagai sitokin utama, memiliki peran kunci dalam mengaktifkan makrofag dan memiliki fungsi yang sangat penting dalam kekebalan seluler terhadap mikroba yang bersifat intraseluler. Selain itu, IFN- γ juga memiliki kemampuan untuk mengatur produksi dan aktivasi sel Treg, yang berperan dalam menekan berbagai respons imun dan memicu *immune tolerance*. Dengan tambahan peran ini, bersama dengan perannya sebagai sitokin pro-inflamasi yang klasik, menunjukkan bahwa IFN- γ memiliki pengaruh yang luas dalam mengatur *respons imun host*.²⁶

IFN- γ memicu aktivasi sejumlah jalur sinyal dan faktor transkripsi yang menginduksi ekspresi enzim pada fagosom makrofag. Selain itu, IFN- γ dapat memicu mekanisme autophagy pada sel yang terinfeksi mikobakteria, yang terkait dengan kekebalan protektif terhadap tuberkulosis.²⁶ IFN- γ juga merangsang pembentukan radikal bebas untuk menghancurkan komponen bakteri *M.tb*, termasuk DNA dan dinding sel bakteri.²⁷

2.5. Enkapsulasi Sel Punca

2.5.1. Definisi Enkapsulasi Sel

Teknologi enkapsulasi sel adalah suatu metode yang dirancang untuk melindungi sel dengan menggunakan bahan yang semi-permeabel, yang bertujuan untuk memfasilitasi pertumbuhan sel dan melindunginya dari respons imun inang yang dapat menolaknya.²⁸

2.5.2. Jenis Enkapsulasi Sel

Enkapsulasi sel dapat bervariasi dalam jenisnya, dan menggunakan berbagai macam jenis polimer. Salah satu jenis kapsulasi yang umum adalah menggunakan hidrogel atau alginat sebagai bahan dasarnya. Kapsulasi sel dengan menggunakan alginat melibatkan kombinasi mannuronic acid (M) dan guluronic acid (G). Alginat dipilih karena memiliki biokompatibilitas yang baik, yang membuatnya cocok sebagai bahan enkapsulasi sel. Sifat ini membantu mencegah masuknya molekul dari luar kapsul yang dapat mengganggu lingkungan internal sel di dalam kapsul.²⁸

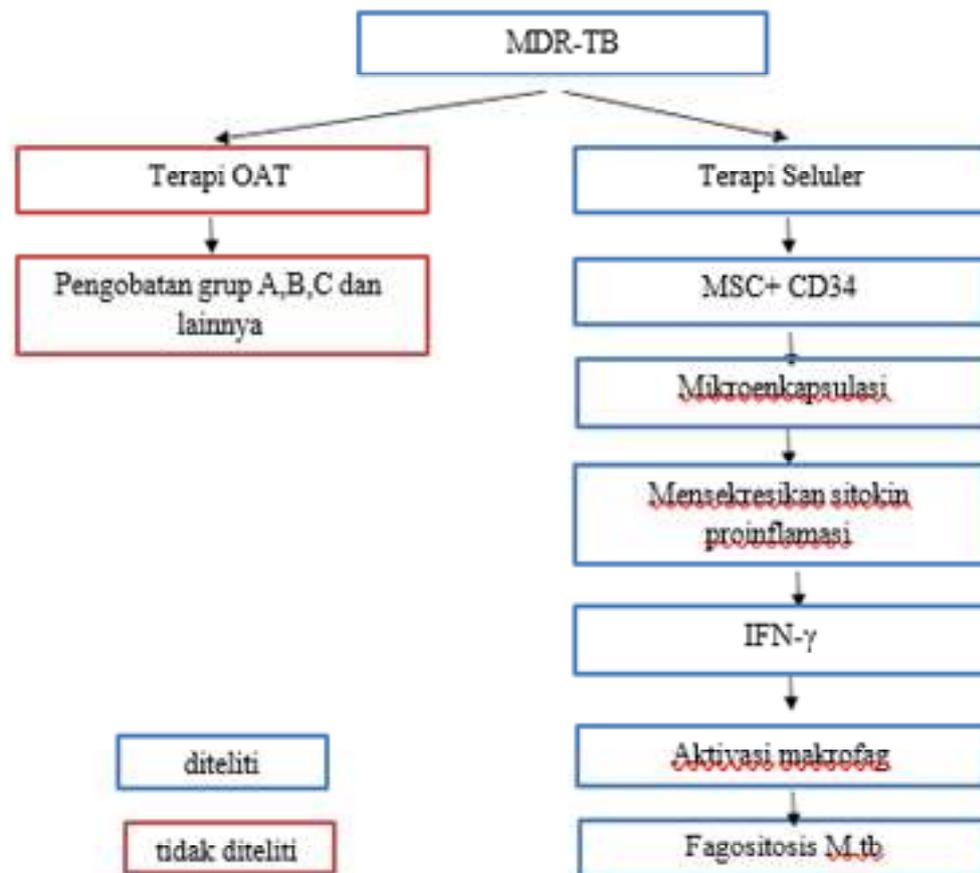
2.5.3. Manfaat Enkapsulasi Sel

Mikroenkapsulasi sel membantu menjaga sel dari pengaruh lingkungan luar kapsul. Penggunaan kapsul juga meningkatkan kelangsungan hidup sel dan menjaga kemampuan sel untuk berkembang biak. Penggunaan alginat dalam enkapsulasi sel memberikan kontrol atas permeabilitas serta sinyal yang diterima oleh sel.²⁹

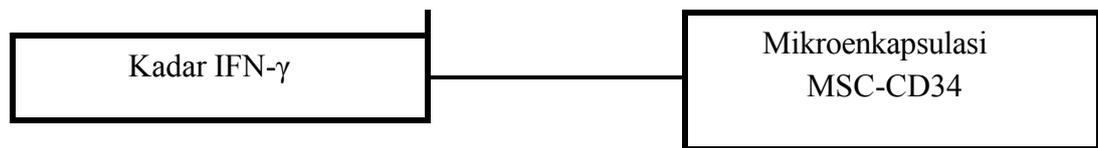
2.5.4. Enkapsulasi Sel Punca dan Keuntungannya

Sel punca memperlihatkan sifat immunomodulasi yang signifikan. Enkapsulasi bertujuan untuk melindungi sel punca dari respon penolakan oleh sistem imun tuan rumah. Dengan demikian, sel punca dapat mempertahankan kemampuannya untuk meregenerasi jaringan yang rusak. Enkapsulasi sel punca juga berperan sebagai agen immunomodulator, sambil mencegah kematian sel akibat pengaruh lingkungan eksternal.³⁰

2.6. Kerangka teori



2.7. Kerangka konsep



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi deskriptif observasional in vitro dengan tahapan sebagai berikut:

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

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian 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⁺
2. Tahap II September - Oktober 2023 : Uji kadar IFN- γ pada kultur mikroenkapsulasi hari ke-2, ke-7, ke-14 dan ke-21 dengan pemeriksaan ELISA

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan penelitian yang diperlukan selama penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1 di bawah ini.

Tabel 3.1 Alat dan Bahan Penelitian

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
1	<i>Cap</i>	Aseptik	1 boks
2	<i>Freezing container</i>	Cryo	1
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
18	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 flowsitometri.

3.4.2 Kultur MSC

Kryopreservasi 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*.

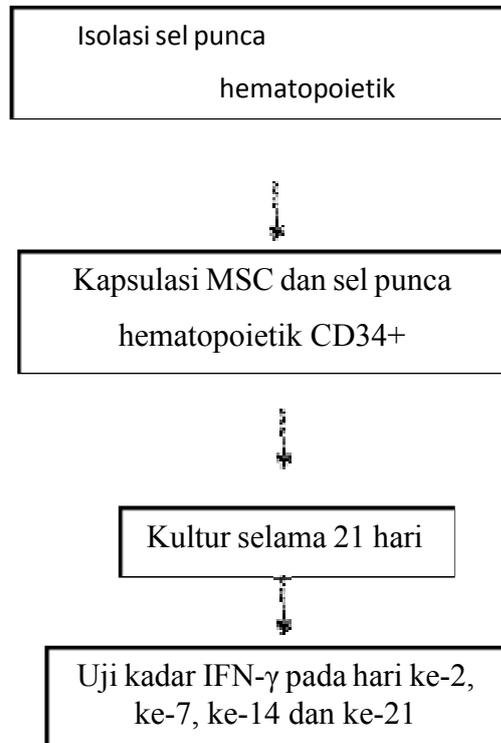
3.4.3 Mikroenkapsulasi MSC dan Sel Punca Hematopoietik CD34⁺

Suspensi 1.600.000 MSC dalam 0,5 mL medium kultur MSC dan suspensi 800.000 sel punca hematopoietik dalam 0,2 mL medium kultur CD34⁺, dicampur dalam tube 2 mL. Total larutan sel adalah 0,6 mL dengan jumlah 2.400.000 sel punca. 2,4 mL larutan alginat 1,8% dicampurkan dengan 0,6 mL larutan yang berisi 2.400.000 sel punca. Larutan alginat 1,8% dan suspensi sel diteteskan ke dalam CaCl 0,2M dengan menggunakan spuit insulin. Kemudian, dicuci dengan PBS dan dimasukkan ke dalam *well* yang telah 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. Analisis dilakukan pada 48 jam, hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21. Kit untuk mengukur kadar IFN- γ menggunakan *Human IFN- γ ELISA Kit* sesuai dengan petunjuk dari produsen. Sinyal absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260nm dan 280 nm.

3.5 Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Prosedur Penelitian

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3.2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
IFN-	IFN- γ adalah sitokin yang berperan pada proses sistem imun sebagai aktivator makrofag.	Spektrofotometri	Kadar IFN- (pg/mL)	Rasio

3.7 Analisis Data

Analisis data berupa hasil absorbansi spektrofotometer dianalisis menggunakan program Excel untuk mengetahui kadar IFN- γ pada mikroenkapsulasi MSC dan CD34.

