

**LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN HASIL PENELITIAN**

**Judul : Gambaran Kadar IL-10 Mikroenkapsulasi MSC-CD34 : Studi
Preliminari Terapi Seluler MDR TB**

Nama : Rachel Teodora Silaen

NPM : 20000019

Dosen Pembimbing I



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

Dosen Pembimbing II



(dr. Novita H Simanjuntak, MARS)

Dosen Penguji



(dr. Renatha Nainggolan, Sp. PK)

Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran



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

**Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas HKBP Nommensen**



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

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang paling sering menyerang paru-paru. Penularan TB dapat terjadi ketika droplet dari pasien TB menyebar melalui udara.¹ Berdasarkan data yang dilaporkan oleh *World Health Organization* (WHO), TB merupakan penyakit yang dapat menyerang semua usia dengan perkiraan 10,6 juta orang terinfeksi di seluruh dunia pada tahun 2021 dan mengalami peningkatan sebanyak 4,5% dari tahun sebelumnya.²

Menurut Kementerian Kesehatan RI berdasarkan *Global TB Report* tahun 2022, Indonesia merupakan negara penyumbang TB tertinggi kedua setelah India, dengan perkiraan 969.000 kasus.³ TB merupakan penyakit yang dapat dicegah dan diobati, dengan standar pengobatan TB aktif selama 6 bulan. Pengobatan TB dengan ketidaksesuaian pemberian obat, serta pemakaian obat secara tidak tepat dan teratur dapat menyebabkan Tuberkulosis resistan obat (TB-RO) atau *Multi Drug Resistant TB* (MDR-TB) yang merupakan resistensi terhadap dua obat lini pertama yaitu rifampisin dan isoniazid.⁴

Berdasarkan data dari *Global Tuberculosis Report WHO* tahun 2022, diperkirakan terdapat 450.000 kasus MDR TB pada tahun 2021 yang mengalami peningkatan sebesar 3,1% dari 437.000 kasus pada tahun 2020, dan 191.000 kematian. Kasus MDR TB di Indonesia sendiri diperkirakan mengalami peningkatan dari tahun 2020 sebanyak 24.000 kasus menjadi 28.000 kasus pada tahun 2022.⁵ Pengobatan MDR TB berdasarkan *WHO Consolidated Guidelines On Drug-Resistant Tuberculosis* memiliki toksisitas yang lebih tinggi dengan durasi pengobatan regimen pendek selama 9-11 bulan dan regimen panjang selama 18-20 bulan sesuai respon pasien terhadap terapi.⁶

Kegagalan pengobatan MDR TB juga tinggi, dengan persentase keberhasilan pengobatan hanya sebesar 60% pada tahun 2019.⁵ Adanya peningkatan kasus dengan durasi pengobatan yang panjang, serta tingginya resiko kegagalan pengobatan MDR TB, merupakan permasalahan yang membutuhkan adanya pengobatan alternatif dalam mengobati MDR TB.

Pada beberapa dekade terakhir telah banyak dikembangkan terapi seluler menggunakan sel punca untuk menangani penyakit infeksi.⁷ Sel punca (*Stem cell*) memiliki sifat *self-renewal*, kemampuan proliferasi, dan kemampuan plastisitas untuk berdiferensiasi menjadi sel yang lebih spesifik.^{8,9} Sel punca mesenkimal (*Mesenchymal Stem Cells/MSK*) dan sel punca hematopoietik

(*Hematopoietic Stem Cells/HSC*) sering digunakan sebagai terapi seluler, termasuk penelitian terhadap TB dan MDR TB.

MSC memiliki peranan penting dalam perbaikan serta regenerasi jaringan, dan HSC yang merupakan progenitor dalam diferensiasi sel darah matur.^{10,11} Penelitian dengan terapi seluler sebelumnya menunjukkan adanya kendala dalam mempertahankan viabilitas sel punca. Kematian sel punca terjadi sebelum sel punca mencapai target organ. Kapsulasi sel punca dengan menggunakan alginat dinyatakan dapat meningkatkan viabilitas sel punca.¹²

Penelitian pengobatan TB dengan MSC sebelumnya menghubungkan efek parakrin dan immunomodulator dengan eliminasi bakteri TB. MSC mensekresikan Interleukin-10 (IL-10), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *hepatocyte growth factor* (HGF), prostaglandin E2 (PGE2), serta anti-inflamasi lainnya.¹³ Sitokin anti-inflamasi yaitu IL-10 yang disekresikan MSC dan HSC memiliki peran penting dalam mengeliminasi bakteri TB, dengan meregulasi respon imun dan membatasi kerusakan jaringan.¹⁴

Hal tersebut di atas mendasari penelitian ini dilakukan, dengan tujuan untuk mengetahui kadar IL-10 pada MSC dan CD34 asal tali pusat sebagai efek parakrin dari MSC dan CD34 yang dienkapsulasi dengan menggunakan kapsul berbasis alginat sebagai studi preliminari terapi alternatif MDR TB.¹⁵ Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar dalam penelitian penggunaan sel punca sebagai terapi seluler MDR-TB.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah gambaran kadar IL-10 mikroenkapsulasi MSC-CD34 sebagai studi preliminari terapi seluler MDR-TB?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan Penelitian ini untuk mengetahui gambaran kadar IL-10 Mikroenkapsulasi MSC-CD34 sebagai studi preliminari terapi seluler MDR-TB

1.3.2 Tujuan Khusus

Yang menjadi tujuan khusus dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran kadar IL-10 Mikroenkapsulasi MSC-CD34

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

1. Mengetahui gambaran kadar IL-10 Mikroenkapsulasi MSC-CD34
2. Studi pendahuluan dalam riset penggunaan mikroenkapsulasi MSC-CD34 sebagai terapi seluler alternatif MDR-TB

1.4.2 Bagi Institusi

Menambah pengetahuan mengenai studi pendahuluan untuk riset penggunaan mikroenkapsulasi MSC- CD34 sebagai terapi alternatif MDR TB

1.4.3 Bagi Masyarakat

Menambah pengetahuan mengenai terapi alternatif MDR TB berbasis mikroenkapsulasi MSC-CD34

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis

2.1.1 Definisi dan Etiologi Tuberkulosis

Tuberkulosis merupakan *communicable disease* yang termasuk dalam penyakit infeksi tertinggi di dunia. Penyebaran bakteri TB dapat melalui udara saat penderita TB batuk ataupun bersin. Selain menginfeksi paru-paru, TB juga dapat menjangkit ekstraparu.¹⁶

Bakteri TB memiliki karakteristik yang kompleks, dikarenakan bakteri tahan asam, fakultatif, katalase negatif, obligat aerobik, serta bakteri intraseluler, dengan dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* tersusun dari glikolipid yang disebut *mycolic-acids-arabinogalactan-peptidoglycan* (mAGP) *complex*. Hal ini mendorong terbentuknya kaseosa jaringan, hipersensitivitas, sitotoksitas, antigen yang dapat merangsang imunitas adaptif, dan menghambat komponen bakteriostatik pada mukosa paru *host*.¹⁷ Karakteristik dinding sel bakteri TB juga mendukung resistensi terhadap beberapa antibiotik dan mendukung ketahanan hidup bakteri pada kondisi ekstrim seperti suasana asam atau basa, rendah oksigen, dan dalam intraseluler.¹⁶

Masa inkubasi TB berkaitan dengan kekebalan imun seseorang, dengan perkiraan 1,7 miliar orang di dunia terinfeksi selama masa inkubasi tanpa memperlihatkan gejala yang jelas.¹⁸

2.1.2 Gejala Klinis Tuberkulosis

Penularan TB paling sering terjadi ketika *droplet nuclei* penderita TB paru dengan diameter partikel <5-10 μm yang mengandung basil *Mycobacterium tuberculosis* menyebar di udara melalui batuk, bersin, atau berbicara. Infeksi juga dapat terjadi apabila droplet mengandung bakteri TB yang bersifat infeksiif terhirup dan terakumulasi pada mukosa saluran nafas. Adanya adhesi bakteri pada makrofag saluran nafas dapat memunculkan respons imun seluler.¹⁹

TB aktif dapat berupa infeksi primer atau reaktivasi infeksi TB. Kegagalan sistem imun dalam mengeliminasi bakteri TB menyebabkan infeksi TB primer.²⁰ Setelah infeksi primer, sebagian besar individu tetap asimtomatik dan mengalami *clear infection*. Pada individu bergejala dapat mengalami demam, keringat malam, gejala pulmonal seperti nyeri dada, batuk kronis, dan batuk berdarah. Terjadinya penurunan berat badan, anoreksia, limfadenopati, ataupun kelelahan tampak sebagai gejala non-pulmonal.²¹

2.1.3 Penegakan Diagnosa Tuberkulosis

Diagnosis TB dapat ditegakkan dengan beberapa pemeriksaan antara lain sebagai berikut :

a. Pemeriksaan mikroskopis basil tahan asam (BTA)

Penegakan diagnosis untuk sebagian besar suspek pasien TB masih menggunakan pemeriksaan sputum basil tahan asam. Pemeriksaan ini sederhana tetapi hanya positif pada sebagian besar pasien TB aktif, dengan menggunakan apusan *Ziehl-Neelsen*. Pewarnaan dilakukan dengan pemberian *carbolfuchsin* dan larutan asam sebagai dekolisasi. Warna merah pada basil *Mycobacterium*

disebabkan karena larutan dekolorisasi yang tidak dapat menembus dinding bakteri. WHO merekomendasikan pada tahun 2010 untuk menggunakan dua sampel sputum dibanding sampel sputum SPS (sewaktu-pagi-sewaktu) dikarenakan sampel sputum ketiga memiliki hasil diagnostik rendah dan adanya keterbatasan sumber daya pada program TB.²²

b. Radiografi toraks

Posisi radiografi toraks yang digunakan pada umumnya adalah posterior-anterior dalam penegakan diagnosis TB. Gambaran radiologi pada awal infeksi bisa terlihat normal dengan penemuan umum lainnya dapat berupa limfadenopati hilar, infiltrasi perihilar, dan efusi pleura.²³ Pada TB post-primer dapat dijumpai gambaran konsolidasi, nodul sentrilobular, kavitas, *ground-glass opacities*, penebalan dinding bronkial, serta nodul milier pada radiografi toraks.²⁴

c. Tes amplifikasi asam nukleat

Diagnosa TB dapat menggunakan tes amplifikasi asam nukleat (NAAT) yang merupakan metode cepat dan sensitif dalam menegakkan diagnosa. Penggunaan tes ini direkomendasikan pada hasil pemeriksaan sputum BTA positif.²² *Polymerase chain reaction* (PCR) yang dikembangkan, termasuk dalam amplifikasi asam nukleat untuk diagnosis cepat penyakit menular seperti TB.²⁵ Berdasarkan penelitian, metode PCR yang memiliki sensitivitas antara 73,33% hingga 84,61%, dan spesifisitas sebesar 80%, merupakan metode deteksi cepat dan spesifik *Deoxyribo Nukleat Acid* (DNA) mikobakteri dalam spesimen klinis yang menggunakan perbedaan suhu untuk mengamplifikasi asam untuk mengandakan DNA yang menjadi target.²⁶

2.1.4 Pengobatan Tuberkulosis

Pengobatan TB bertujuan untuk mengeliminasi pertumbuhan bakteri dari orang yang terinfeksi, mencegah terjadinya relaps, dan mengurangi risiko terjadinya resistensi pengobatan.²¹ Lama pengobatan dilakukan selama minimal enam bulan, dengan dua bulan fase intensif menggunakan rifampicin (RIF), isoniazid (INH), pyrazinamide (PZA), dan ethambutol (EMB). Pengobatan fase lanjutan dilakukan selama dua bulan dengan menggunakan rifampicin dan isoniazid.²² Dalam pengobatan TB, dapat diterapkan *Directly Observed Therapy* (DOT) yang merupakan observasi langsung untuk meningkatkan kepatuhan pasien dalam menjalani terapi.²¹

2.2 Multi Drug Resistance Tuberculosis (MDR TB)

2.2.1 Definisi MDR TB

TB RO dapat berupa MDR TB, yang disebabkan oleh resistensi bakteri terhadap setidaknya dua jenis obat anti tuberkulosis (OAT) lini pertama yaitu rifampicin dan isoniazid, serta *Extensively drug-resistant TB* (XDR-TB) yang merupakan resistensi pada fluorokuinolon dan setidaknya satu OAT lini kedua.²⁷ Masalah utama dalam pengobatan TB merupakan MDR TB, dengan peluang perkembangan penyakit lebih tinggi 3.8% pada negara berkembang.²¹ Resistensi primer berkembang ketika pasien terpapar dan terinfeksi dengan bakteri yang sudah resistan terhadap obat, sedangkan resistensi sekunder dapat berkembang karena pengobatan yang tidak adekuat.²⁸

Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* dapat disebabkan oleh mutasi kromosom, perubahan struktural pada bakteri, serta penurunan akumulasi, dan inaktivasi pengobatan yang menyebabkan OAT tidak mampu menghambat bakteri.²⁹ MDR TB memiliki gejala yang bertahan lama akibat bakteri yang sulit dieliminasi oleh tubuh, tetapi identik dengan gejala TB tanpa resistensi obat. Gejala tersebut meliputi penurunan berat badan, demam, kelelahan, dan batuk kronis.³⁰

2.2.2 Penegakan diagnosa MDR TB

Penggunaan tes molekuler telah dikembangkan untuk penegakan diagnosa MDR TB melalui amplifikasi asam nukleat, dengan mendeteksi mutasi DNA spesifik berkaitan dengan resistensi terhadap OAT. Tes genotipe dapat dilakukan karena memiliki keunggulan yaitu hasil yang cepat dan lebih akurat dibandingkan dengan tes fenotipe dalam melakukan diagnosa.³¹ Pemeriksaan yang dapat dilakukan antara lain :

a. DNA Line Probe Assays

Uji *Line probe assay* (LPAs) merupakan uji hibridisasi DNA untuk mendeteksi mutasi dan direkomendasikan sebagai skrining resistensi obat pada sampel BTA positif.³² Dalam mendeteksi resistensi terhadap rifampicin dan isoniazid dapat digunakan *first line LPA*, serta *second line LPA* untuk mendeteksi resistensi obat injeksi lini kedua dan fluorokuinolon.³¹

b. Xpert MTB/RIF dan Xpert MTB/RIF ultra

WHO merekomendasikan pada tahun 2020, penggunaan tes cepat molekuler dalam penegakan diagnosa tuberkulosis resistensi obat.³³ *Xpert MTB/RIF* menggunakan *real-time* PCR untuk mengidentifikasi mutasi bakteri yang resisten rifampicin dari sampel sputum dengan hasil didapatkan dalam waktu dua jam.³⁴ Sedangkan, *Xpert*

MTB/RIF ultra menggunakan *GeneXpert* yang sama dengan peningkatan sensitivitas dalam mendeteksi resistensi bakteri dibandingkan *Xpert MTB/RIF*.³⁵

2.2.3 Pengobatan MDR TB

Pemberian obat terhadap pasien MDR TB harus dengan pengawasan dan penatalaksanaan yang tepat untuk dapat menghindari penularan ke orang lain.²⁸ Pengobatan MDR TB menurut *WHO consolidated guidelines on tuberculosis* pada tahun 2022, diberikan menurut durasi pengobatan yang terdiri dari :

a. Pengobatan regimen pendek

Pengobatan MDR TB terstandarisasi pada regimen pendek diberikan selama 9-12 bulan, dengan fase intensif selama 4 bulan yang terdiri dari bedaquiline dalam kombinasi dengan FQ (levofloxacin atau moxifloxacin) diberikan selama 6 bulan, ethionamide (atau linezolid dengan dosis 600 mg setiap hari), etambutol, isoniazid dosis tinggi, pirazinamid dan klofazimin. Pemberian fase lanjutan dengan fluorokuinolon, klofazimin, etambutol, dan pirazinamid.³⁶

b. Pengobatan regimen panjang

Pemberian pengobatan individual pada regimen panjang selama 18-20 bulan mencakup pengelompokan obat grup A (moxifloxacin/levofloxacin, bedaquiline, linezolid), grup B (cycloserine/terizidone, clofazimine), dan grup C (amikacin/streptomycin, ethambutol, prothionamide, pyrazinamide). Pemberian fase intensif dilakukan selama 6-7 bulan dengan empat obat anti-tuberkulosis (tiga grup A dan setidaknya satu grup B).^{36,37}

2.3 Sel Punca

Sel punca merupakan sel induk imatur dengan potensi dalam proliferasi dan *self-renewal* yang memungkinkan regenerasi sel yang rusak dengan memberikan efek terapeutik. Kemampuan sel punca dalam menghambat peradangan, mengurangi risiko apoptosis, menstimulasi pembentukan vaskular, menjadi dasar dalam terapi berbasis sel punca.³⁸ Sumber sel punca didapat dari jaringan dewasa ataupun neonatal. Penggunaan sel punca asal jaringan dewasa seperti sum-sum tulang dan jaringan adiposa melibatkan prosedur yang invasif, sehingga kemampuan proliferasi sel punca dimanfaatkan dari sel punca hematopoietik dan sel punca mesenkimal asal tali pusat.³⁹

2.3.1 Sel Punca Mesenkimal

Kemampuan multipotensi yang dimiliki MSC berperan dalam regenerasi, perbaikan jaringan, serta diferensiasi menjadi beberapa jenis sel seperti adiposit, kondrosit, dan mendorong sel endotel dalam pembentukan pembuluh darah (angiogenesis).^{40,41} Dalam aplikasi klinis, sumber MSC diperoleh dari *adult* MSC meliputi sum-sum tulang, jaringan adiposa, dan pulpa gigi. MSC yang berasal dari jaringan neonatal diperoleh dari plasenta, amnion, dan tali pusat.⁴² MSC asal tali pusat memiliki kemampuan proliferasi, angiogenesis, serta immunomodulator, diambil dari bagian *Wharton's jelly* yang memiliki elastisitas dengan mengandung glikosaminoglikan berupa asam hialuronat dan kondroitin sulfat.⁴³

MSC memiliki kemampuan migrasi, adhesi, dan perlekatan pada jaringan yang ditargetkan. Migrasi MSC melibatkan sitokin inflamasi dan reseptor kemokin seperti CXCR4 sehingga proses *homing* juga dapat dipengaruhi kondisi saat pengkulturan.⁴⁴ Kriteria identifikasi menurut *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) terhadap MSC, yaitu tumbuh pada kondisi kultur standart dan mengekspresikan CD73, CD90, dan CD105 sebagai penanda permukaan sel.⁴⁵ Immunomodulasi MSC meregulasi respon imun dengan sekresi sitokin, dan faktor parakrin seperti prostaglandin E2 (PGE2), TGF- β , indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), dan IL-10.⁴¹ Sitokin IL-10 dan PGE2 yang disekresikan oleh MSC berperan dalam imunitas nonspesifik dalam menghambat diferensiasi sel Th17 dan imunitas spesifik dengan merangsang sel NK mensekresikan IFN- γ untuk meningkatkan regenerasi jaringan dan pertahanan pada lokasi cedera. Produksi IL-10 oleh MSC juga membantu mentransformasi makrofag tipe 1 inflamasi menjadi makrofag tipe 2 anti-inflamasi yang penting dalam regulasi pembentukan granuloma pada infeksi TB.^{46,47}

2.3.2 Sel Punca Hematopoietik CD34

HSC merupakan sel dengan multipotensi yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis turunan sel darah. HSC dapat ditemukan pada sum-sum tulang, darah tepi, dan darah tali pusat.⁴⁸ CD34 merupakan glikoprotein transmembran yang diekspresikan sebagai penanda permukaan HSC yang berfungsi dalam pensinyalan transmembran.

Sel punca hematopoietik CD34 memiliki respon proliferasi dan parakrin dalam perbaikan vaskular yang rusak dengan sekresi 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 mensekresikan IL-4, IL-6, PGE2, serta TGF- β dan IL-10 yang berperan sebagai immunomodulator dan memiliki respon anti-inflamasi.⁴⁹

2.4 Enkapsulasi Sel Punca

2.4.1 Defenisi Enkapsulasi Sel

Bioteknologi enkapsulasi sel merupakan teknik melapisi sel hidup dengan membran semipermeabel yang memungkinkan sel dapat tumbuh dan mengekspresikan immunomodulator. Polimer biokompatibel yang digunakan untuk melapisi sel, memungkinkan sel yang dienkapsulasi tidak dikenali oleh sistem imun *host*.⁵⁰

2.4.2 Jenis Enkapsulasi Sel

Teknik enkapsulasi sel dapat dibedakan menjadi makroenkapsulasi dan mikroenkapsulasi. Kelompok sel yang dikapsulasi lebih besar pada makroenkapsulasi dibanding mikroenkapsulasi yang memiliki diameter 100-1500 μm . Membran polimer semi-permeabel yang melapisi mikrokapsul bermanfaat untuk melindungi sel dengan mencegah masuknya molekul seperti antibodi dan respons imun *host*.⁵¹ Mikroenkapsulasi dapat menggunakan polimer yang terdiri atas polimer sintetis dan alami. Perlunya modifikasi dan kurangnya adhesi sel menjadi kelemahan dari polimer sintetis, sedangkan polimer alami seperti alginat merupakan biopolimer yang banyak digunakan dalam terapi berbasis sel. Biopolimer alginat tersusun dari dua polisakarida yaitu β -D-mannuronic acid (M) dan α -L-guluronic acid (G) yang dihubungkan ikatan glikosida (1-4). Karakteristik alginat dalam penggunaannya memiliki biokompatibilitas non-toksikitas dan non-antigenisitas.^{52,53}

2.4.3 Manfaat Enkapsulasi Sel

Mikroenkapsulasi memiliki kontrol secara fisik dan kimia yang lebih baik dikarenakan ukuran yang lebih kecil dari makrokapsul, sehingga lebih tahan secara mekanis dengan meningkatkan rasio luas permukaan terhadap volume untuk pengangkutan zat terlarut melintasi membran.⁵⁰ Enkapsulasi sel menggunakan alginat memiliki permeabilitas, regulasi pensinyalan seluler, biodegradasi, dan dalam aplikasi terapeutik bertujuan untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel alogenik.¹²

2.4.4 Enkapsulasi Sel Punca dan Keuntungannya

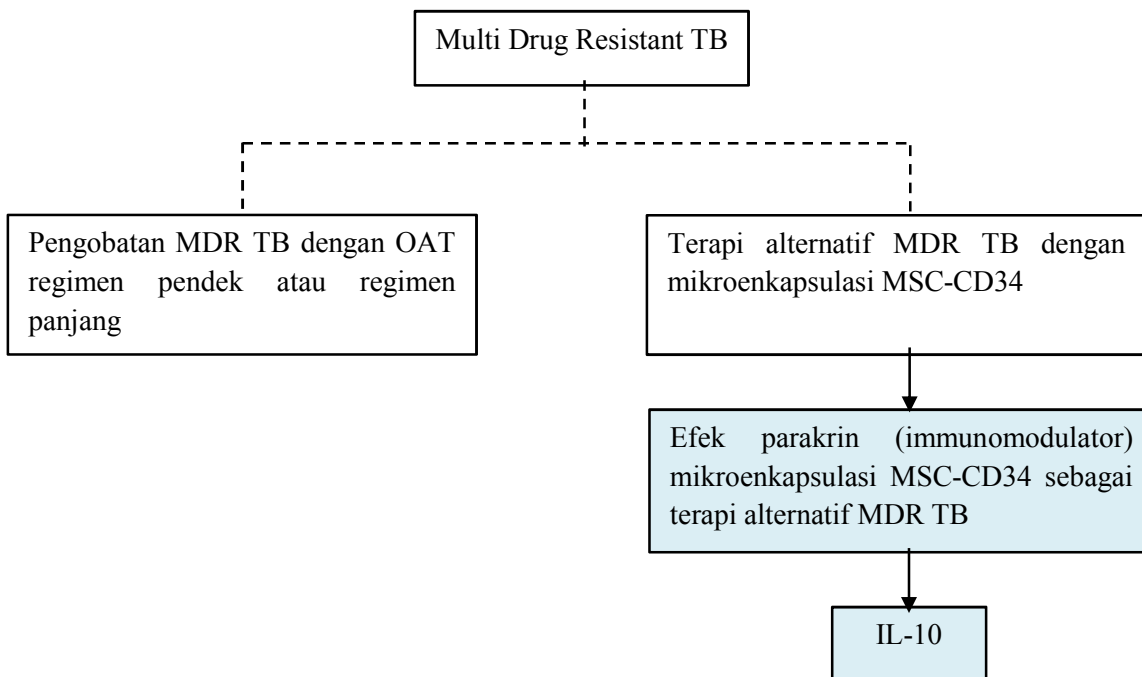
Sel punca memiliki kemampuan berdiferensiasi, mensekresikan sitokin, dan *growth factor* untuk meregulasi sistem imun. Dalam meningkatkan ekspansi sel dan regenerasi pada jaringan, dilakukan ko-kultur pada MSC dengan HSC. Teknologi enkapsulasi bertujuan untuk meningkatkan viabilitas dan melindungi proses migrasi sel punca dari respon imun tubuh untuk mencapai kemampuan sel punca

dalam meregenerasi jaringan.⁵⁴ Enkapsulasi sel punca menggunakan alginat juga berperan dalam immunomodulator, dan mencegah pembentukan jaringan fibrotik.⁵³

2.5 Interleukin-10

Immunomodulasi pada MSC melibatkan interaksi sistem imun, dengan sekresi IL-10, PGE2,IDO, dan TGF- β . Sitokin IL-10 mengontrol respon pro-inflamasi dan meningkatkan eliminasi sel apoptosis, sehingga berperan sebagai anti-inflamasi dan perbaikan jaringan.⁵⁵ Pada sel punca hematopoietik CD34, ekspresi IL-10 memiliki peran dalam immunomodulasi dan anti-inflamasi merangsang imunitas spesifik dan non-spesifik, dengan menginduksi makrofag M2 dan Treg.⁵⁶ Peran IL-10 terhadap bakteri TB, yaitu dengan menurunkan respons imun dan menekan fungsi makrofag dan sel dendritik yang bertujuan mengontrol respons imun dan membatasi cedera jaringan.⁵⁷

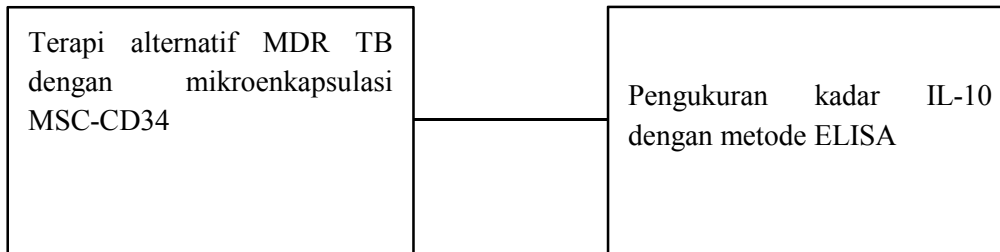
2.6 Kerangka Teori



 : Diteliti

 : Tidak diteliti

2.7 Kerangka konsep



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi preliminari eksperimental in vitro dengan pendekatan deskriptif observasional. Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Kultur MSC dan sel punca hematopoietik CD34⁺

2. Kapsulasi sel punca hematopoietik CD34⁺
3. Uji kadar IL-10 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 IL-10 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 dipakai 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
19	IL-10 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 *trypan blue* dan kemurnian sel punca hematopoietik CD34⁺ dianalisa dengan menggunakan flowsitometri.

3.4.2 Kultur MSC

Kryopreservasi MSC asal tali pusat dari penelitian sebelumnya dithawing 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 37°C, 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 0,4 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, lalu dicuci 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.

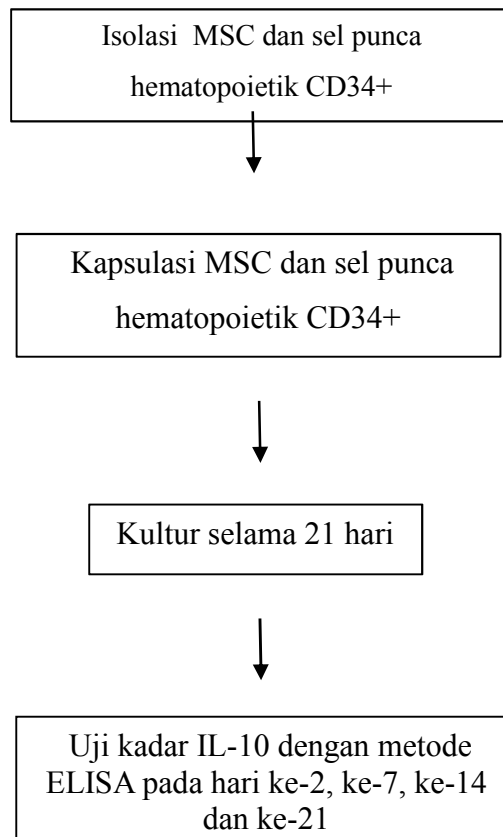
3.4.4 Analisa IL-10 dengan ELISA

Analisis Kadar IL-10 mikroenkapsulasi MSC-CD34 dilakukan pada 48 jam, hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21 menggunakan metode ELISA dengan tahapan sebagai berikut :

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 μ L ke tabung S6, dan 500 μ L ke tabung S5 - S0.
4. Masukkan standard yang sudah dilarutkan, 100 μ L ke tabung S6, mix well.
5. Kemudian 500 μ L 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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.

3.5 Prosedur Penelitian



3.6 Analisa Data

Data pada penelitian ini didapatkan melalui hasil pengukuran kadar IL-10 Mikroenkapsulasi MSC-CD34 menggunakan metode ELISA, dianalisis dengan grafik menggunakan *Microsoft Excel*.