



Artikel Penelitian

PERBEDAAN KADAR IFN- γ MIKROENKAPSULASI SEL PUNCA MESENKIMAL COATED DAN NON-COATED

DIFFERENCES IN IFN- γ LEVELS IN COATED and NON-COATED MESENCHYMAL STEM CELL MICROENCAPSULATION

Maria Manuella Sibarani^a, Ervina Julien Sitanggang^a, Dina Octafrida Marpaung^a, Christine Verawaty Sibuea^a

^aFakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan, Jl. Dr. Sutomo No. 4A, Medan, 20235, Indonesia

Histori Artikel

Diterima:
21 Februari 2024

Revisi:
21 Mei 2024

Terbit:
1 Juni 2024

ABSTRAK

Sampai saat ini *multi-drug resistant tuberculosis* (MDR-TB) masih menjadi masalah kesehatan global. Fokus utama pengobatan MDR-TB bergantung pada kombinasi antibiotik sebagai terapi penyembuhan bakteriologis yang dapat menyebabkan beberapa efek samping yang merugikan. Penelitian menggunakan sel punca mesenkimal mulai dikembangkan sebagai bentuk terapi baru. Sel punca mesenkimal berfungsi sebagai imunomodulator dan mampu menyekresikan berbagai jenis sitokin, salah satunya IFN- γ . Pada MDR-TB, IFN- γ dapat meningkatkan respons imun seluler untuk mengaktifkan makrofag sebagai penghancur mikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan kadar IFN- γ pada medium kultur antara mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal yang disalut (*coated*) dan tidak disalut (*non-coated*) lisat konsentrat trombosit sebagai studi preliminari terapi seluler MDR-TB. Penelitian ini merupakan penelitian analitik-observasional. Kadar IFN- γ diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450nm. Data yang didapat kemudian dianalisis menggunakan uji *Mann-Whitney*. Dari hasil penelitian diperoleh sekresi IFN- γ pada kelompok *non-coated* pada hari ke-2, ke-7, ke-14, dan ke-21 masing-masing sebanyak 0,018 pg/mL, 0,0616 pg/mL, 2,2735 pg/mL, dan 2,2735 pg/mL, sedangkan pada kelompok *coated* diperoleh data pada hari ke-2, ke-7, ke-14, dan ke-21 masing-masing sebanyak 0 pg/mL, 0 pg/mL, 0,0512 pg/mL, dan 1,7165 pg/mL. Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coated* dan *non-coated*.

Kata Kunci

Sel punca Mesenkimal,
MDR-TB, IFN- γ ,
Sitokin,
Imunomodulator

ABSTRACT

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) continues to be a prominent concern in the field of global health. As bacteriological cure methods, MDR-TB treatment primarily entails the administration of a combination of antibiotics, which may induce undesirable side effects. The investigation of mesenchymal stem cells as a potential therapeutic intervention commenced. Immunomodulators by nature, mesenchymal stem cells are capable of secreting a variety of cytokines, including IFN-. IFN- may augment cellular immune responses in MDR-TB, hence stimulating macrophages to function as microbial killers. As a preliminary investigation into MDR-TB cellular therapy, the purpose of this study is to compare the IFN- levels in the culture medium of microencapsulated mesenchymal stem cells that are coated and those that are not coated with platelet concentrate lysate. This research employs an analytical-observational design. The concentrations of IFN- γ were determined with a spectrophotometer set at 450 nanometers. Following this, the collected data were examined utilizing an Mann-Whitney test. Based on the findings of the research, the non-coated group exhibited IFN- γ secretion levels of 0.018 pg/mL, 0.0616 pg/mL, 2.2735 pg/mL, and 2.2735 pg/mL on the second, seventh, fourteenth, and twenty-first days, respectively. In contrast, the coated group demonstrated IFN- γ secretion levels of 0 pg/mL, 0 pg/mL, 0.0512 pg/mL, and 1.7165 pg/mL on the same days. There was no discernible distinction in IFN- γ levels between the growth media for coated and uncoated mesenchymal stem cells microencapsulation, as determined by Mann-Whitney tests.

Korespondensi

Telp: 08122419449
Email:
ervinajulien@uhn.ac.id

PENDAHULUAN

Multi-drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) yang resistan terhadap setidaknya dua jenis obat antituberkulosis (OAT) lini pertama seperti rifampisin dan isoniazid.¹ Penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan global. Estimasi jumlah penderita MDR-TB tahun 2021 secara global sebanyak 450.000 kasus, di mana 191.000 di antaranya mengalami kematian.² Saat ini pengobatan MDR-TB dilakukan selama 9-20 bulan.³ Pengobatan MDR-TB saat ini masih bergantung pada kombinasi antibiotik sebagai fokus utama penyembuhan bakteriologis. Menurut penelitian oleh Tae won dkk., efek samping terkait pengobatan MDR-TB yang diamati pada 95 dari 256 pasien yaitu berupa ototoksisitas, nefrotoksisitas, hipotiroidisme, hepatotoksisitas, gangguan kejiwaan, serangan epilepsi, dan gangguan saluran cerna.⁴ Dengan timbulnya efek samping dari terapi yang tidak memuaskan ini, maka berbagai penelitian mulai dikembangkan untuk mengatasi keterbatasan ini. Salah satu pengobatan yang memungkinkan untuk pengobatan MDR-TB adalah dengan sel punca mesenkimal (*mesenchymal stem cells*).

Sel punca mesenkimal merupakan sel yang mampu melakukan pembaharuan diri dan berdiferensiasi menjadi bentuk sel lain yang lebih spesifik dan fungsional.⁵ Fungsi imunomodulatornya, serta kemampuannya untuk mengganti atau memperbaiki jaringan yang rusak merupakan alternatif pengobatan yang ideal untuk penyakit kronis.⁶ Sel punca mesenkimal dapat diperoleh serta dikembangkan dari beberapa jaringan salah satunya jaringan ikat mukosa pada tali pusat yang dikenal sebagai *Wharton jelly*.

Sel punca mesenkimal banyak menyekresikan molekul pensinyalan sel, seperti *growth factor*, sitokin, dan kemokin yang membantu aktivitas biologis sesuai dengan lingkungan mikro yang melingkupinya.⁷ Pada infeksi TB dan MDR-TB beberapa sitokin yang berperan dalam respons imun dan patologis adalah *Interleukin-10* (IL-10),

interferon gamma (IFN- γ) dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α).⁸ IFN- γ merupakan sitokin berupa protein berjenis glikoprotein yang disekresi oleh sel sebagai respons defensi akibat rangsangan biologis, seperti virus, bakteri, dan senyawa lainnya.⁹ IFN- γ memainkan peran penting dalam mengkoordinasikan respons imun bawaan dan adaptif sebagai agen imunomodulasi serta mengaktifkan banyak program antimikroba melalui proses pensinyalan.^{10,11} Dalam lingkungan inflamasi, IFN- γ memicu aktivasi respons imun dan merangsang eliminasi patogen, serta mencegah aktivasi berlebihan dari sistem kekebalan dan kerusakan jaringan.⁹

Adapun kelemahan dalam terapi berbasis seluler adalah sel punca mesenkimal dapat begitu cepat kehilangan fungsi saat tubuh memberikan sinyal sistem kekebalan tubuh kepada sel untuk melakukan fagositosis. Dalam penelitian Sibuea dkk., sel punca asal tali pusat yang telah dikultur dapat bertahan hingga hari ke-14.¹² Faktor yang memengaruhi kondisi optimum sel kultur adalah kondisi fisiologis kultur dan lingkungan mikroseluler kultur yang menyerupai keadaan jaringan *in vivo*.¹³

Teknik enkapsulasi pada sel punca mesenkimal akan mencegah sel secara langsung masuk ke pembuluh darah, dengan tujuan untuk menilai sejauh mana sel yang dienkapsulasi mempertahankan karakteristik sel.¹⁴ Pemberian *coating* (penyalut lisat konsentrat trombosit) digunakan untuk melapisi permukaan kultur sebagai upaya meningkatkan perlekatan dan viabilitas pertumbuhan sel punca mesenkimal.¹⁵ Berdasarkan uraian pendahuluan di atas, dan macam perbedaan pengkondisian kultur, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan kadar IFN- γ pada medium kultur antara mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coated* dan *non-coated* sebagai studi preliminari terapi seluler MDR-TB.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analitik-observasional. Penelitian ini dilakukan di *Stem Cells and Tissue Engineering (SCTE) Indonesian*

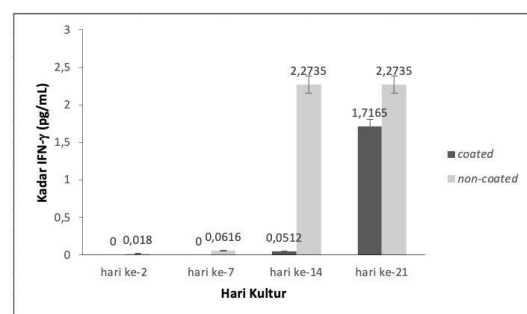
Medical Education and Research Institute (IMERI) FK UI. Sel punca mesenkimal diisolasi dari *Wharton's jelly* talipusat dengan metode *multiple harvest explant* ekspresi CD 105, CD 90, dan CD 73 diukur menggunakan *flow-cytometry* mengikuti kriteria International Society Cell dan Gene Therapy untuk sel punca mesenkimal. Kemudian sel punca mesenkimal dikultur menggunakan Alpha-Minimum Essential Medium (Gibco™, Cat.12571063) yang disuplementasi dengan lisat konsentrat trombosit dan heparin. 3 mL larutan alginat 1,8% dicampurkan dengan 0,5 mL larutan berisi sel punca mesenkimal yang diteteskan ke dalam CaCl 0,2M menggunakan spuit insulin. Untuk kelompok dengan *coated*: 2 ml lisat konsentrat trombosit+heparin 200mikro kapsul disuspensikan ke dalam lisat konsentrat trombosit + heparin dan inkubasi selama 10 menit lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal dikultur dalam medium kultur selama 21 hari.

Analisis kadar IFN- γ dilakukan pada hari ke-2, hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21. Kit untuk mengukur kadar IFN- γ menggunakan Human ELISA Kit IFN- γ (Quantikine, Cat. DIF50C). Sinyal absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450nm. Untuk membandingkan antara kelompok mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coated* dan *non-coated*, data dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney karena data tidak terdistribusi normal, dengan nilai $p < 0,05$. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan menu analisis data pada perangkat lunak excel. Penelitian ini telah lulus kajietik oleh KEPK FKUI-RSCM dengan nomor S-436/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2023.

HASIL

Pada penelitian ini ditemukan bahwa kadar IFN- γ pada kelompok *coated* hari ke-2 dan ke-7 tidak ditemukan, dan mulai muncul pada hari ke-14 dan ke-21 meskipun lebih kecil dari kelompok *non-coated*. Pada kelompok *non-coated* kadar IFN- γ sudah ditemukan pada hari ke-2 meskipun relatif kecil dan semakin lama semakin

meningkat. Kadar tertinggi IFN- γ yang dihasilkan oleh sel punca mesenkimal pada medium kultur mikroenkapsulasi baik *coated* maupun *non-coated* terjadi pada hari ke-21 yaitu sebesar $1,7165 \pm 0,0711$ pg/mL untuk kelompok *coated*, kemudian $2,2735 \pm 0,3435$ pg/mL untuk kelompok *non-coated*. Dari hasil uji hipotesis dengan uji *Mann-Whitney U Test* ditemukan bahwa nilai $p=0,144$ ($p>0,05$), sehingga disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi kelompok *coated* maupun *non-coated*. (Gambar 1).



Gambar 1. Rata-Rata dan SEM Kadar Sekresi IFN- γ Coated dan Non-coated

DISKUSI

Pada penelitian ini ditemukan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar IFN- γ pada medium kultur mikroenkapsulasi antara *coated* maupun *non-coated*. Kadar IFN- γ yang tidak berbeda dan angka sekresi yang relatif kecil antara mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal baik *coated* maupun *non-coated*, dapat terjadi karena kondisi lingkungan mikro dari sel punca mesenkimal. Berdasarkan pernyataan ini, maka sejalan dengan penelitian Kyurkchiev D, dkk. yang menyatakan bahwa sel punca mesenkimal tidak selalu mengeluarkan sitokin terutama IFN- γ , TNF α dan IL-1 β . Hal ini dianggap dapat terjadi karena kondisi lingkungan mikro serta keterlibatan *Toll-like receptors* (TLR) yang mengatur efek pro-inflamasi dan anti-inflamasi.¹⁶

Kadar tertinggi IFN- γ yang dihasilkan oleh sel punca mesenkimal pada medium kultur mikroenkapsulasi baik *coated* maupun *non-coated* terjadi pada hari ke-21 yang berarti telah terbukti bahwa dengan menggunakan teknik

enkapsulasi, sel punca mesenkimal dapat dipertahankan hingga jangka waktu lebih panjang. Hal ini sejalan dengan penelitian Wilson dan Mcdevitt, yang menyatakan bahwa selain perlindungan kekebalan, enkapsulasi juga menyediakan lingkungan mikro yang lebih konsisten untuk sel tertutup dengan stabilitas mekanis jangka panjang yang lebih baik.¹⁷

Kondisi lain yang juga dapat memengaruhi kadar IFN- γ ialah tidak dijumpainya sel T yang teraktivasi dalam lingkungan mikro eksperimen *in-vitro* sehingga efek imunomodulasi yang diperantarai oleh sel punca mesenkimal tidak masif terjadi. Hal ini juga dinyatakan dalam penelitian Fajarwati, yaitu proliferasi sel T tidak dapat ditekan ketika sel punca mesenkimal dan sel T dikultur terpisah secara fisik. Imunosupresi yang diperantarai sel punca mesenkimal membutuhkan aktivasi awal oleh sel imun melalui sekresi sitokin proinflamasi, di mana IFN- γ dan TNF- α adalah produk penting dari sel T.¹⁸

Lisat konsentrat trombosit mengandung berbagai macam *growth factor*.¹⁹ Pemberian penyalut lisat konsentrat trombosit pada medium kultur pada penelitian ini tidak berpengaruh bahkan cenderung mengeluarkan sekresi lebih kecil. Hal ini mungkin saja terjadi karena keadaan yang bervariasi dalam pembuatan lisat konsentrat trombosit dapat memengaruhi efisiensinya, serta beberapa sumber variabilitas dalam teknologi lisat konsentrat trombosit yang memengaruhi proses proliferasi. Hal-hal yang dapat memengaruhi di antaranya jumlah trombosit, prosedur aktivasi, dan variabilitas antar individu sebagai pendonor.²⁰

KESIMPULAN

Berdasarkan data dan hasil yang didapatkan dari penelitian yang telah dilakukan terkait perbedaan kadar IFN- γ mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal *coated* dan *non-coated* sebagai studi preliminari terapi seluler MDR-TB maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar IFN- γ pada medium kultur antara mikroenkapsulasi sel punca mesenkimal

coated dan *non-coated* dengan nilai $p = 0,144$. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian *in-vitro* dengan melakukan pengkondisian lingkungan mikroseluler agar memperoleh sekresi yang lebih optimal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh hibah dari Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, Simlitabmas 2022.

DAFTAR REFERENSI

1. Global Tuberculosis Report. *TB Treatment and Treatment Coverage*.; 2022. [ps://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-diagnosis-treatment/3-3-tb-treatment-and-treatment-coverage](https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-diagnosis-treatment/3-3-tb-treatment-and-treatment-coverage)
2. CDC. The Urgent Threat of TB Drug Resistance. Published 2023. http://www.cdc.gov/globalhivtb/images/dg ht_mdr-tb_factsheet_10-14-2016_ck_v3.pdf
3. World health organization. Tuberculosis. world health organization.
4. Yang TW, Park HO, Jang HN, et al. Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis at a tuberculosis referral hospital in South Korea. *Medicine*. 2017;96(28):e7482. doi:10.1097/MD.0000000000007482
5. Putra A. Konsep dasar sel punca. In: Soebandrio A, Kusnadi Y, eds. *Basic Molecular Stem Cell*. Unissula press; 2019:2-10.
6. Kanai R, Nakashima A, Doi S, et al. Interferon- γ enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis. *Sci Rep*. 2021;11(1):1-14. doi:10.1038/s41598-020-79664-6
7. Putra A. Model komunikasi sel punca parakrin. In: Soebandrio A, Kusnadi Y, eds. *Unissula Press*. Vol 1. Unissula press; 2019:133-142.
8. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41(9):653-664. doi:10.1016/j.tips.2020.06.009
9. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res*. 2020;8(1):49. doi:10.1186/s40364-020-00228-x
10. Forrest J, Robert B, Benjamin S, Tara W, Dana S, M. BC. Interferon gamma reprograms host mitochondrial metabolism through inhibition of complex II to control intracellular bacterial replication. *Infect Immun*. 2020;88(2):10.1128/iai.00744-19. doi:10.1128/iai.00744-19

11. Mezouar S, Mege JL. Changing the paradigm of IFN- γ at the interface between innate and adaptive immunity: macrophage-derived IFN- γ . *J Leukoc Biol.* 2020;108(1):419-426. doi:<https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0420-619RR>
12. Sibuea CV, Pawitan JA, Antariato R. Pengaruh Penggantian Medium terhadap Viabilitas Hepatosit Kultur 3D Organoid Hati Stem Cells and Tissue Engineering Cluster, Indonesian Medical and Education Research Korespondensi. *NJM.* 7(2):2022.
13. Landázuri N, D Levit R, Joseph G, et al. Alginate microencapsulation of human mesenchymal stem cells as a strategy to enhance paracrine mediated vascular recovery after hindlimb ischaemia. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;12(3):1-10. doi:10.1002/term.1680
14. Putra A. Isolasi dan kultur sel punca. In: Soebandrio A, Kusnadi Y, eds. *Basic Molecular Stem Cell.* Unissula press; 2019:45.
15. Green DW, Li G, Milthorpe B, Ben-Nissan B. Adult stem cell coatings for regenerative medicine. *Materials Today.* 2012;15(1-2):60-66. doi:10.1016/S1369-7021(12)70021-4
16. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014;6(5):552. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.552
17. Wilson JL, McDevitt TC. Stem cell microencapsulation for phenotypic control, bioprocessing, and transplantation. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(3):667-682. doi:10.1002/bit.24802
18. Fajarwati S. Hambatan mesenchymal stem cell terhadap proliferasi limfosit T. *Jurnal Biosains Pascasarjana Universitas Airlangga.* 2018;20.
19. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open Medicine.* 2016;11(1):242-247. doi:10.1515/med-2016-0048
20. Rubio-Azpeitia E, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1):52-62.