

DISERTASI

**RESPON *GRAFT VERSUS HOST DISEASE* (GvHD) PADA KO-
KULTIVASI SEL PUNCA MESENKIMAL TALI PUSAT DAN
SEL PUNCA HEMATOPOITIK CD34⁺ DARAH TEPI
TALASEMIA MAYOR
(PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS)**



MOCHAMAD SYAIFUDIN

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

DISERTASI

**RESPON *GRAFT VERSUS HOST DISEASE* (GvHD) PADA KO-
KULTIVASI SEL PUNCA MESENKIMAL TALI PUSAT DAN
SEL PUNCA HEMATOPOITIK CD34⁺ DARAH TEPI
TALASEMIA MAYOR
(PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS)**



MOCHAMAD SYAIFUDIN

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

DISERTASI

**RESPON *GRAFT VERSUS HOST DISEASE* (GvHD) PADA KO-
KULTIVASI SEL PUNCA MESENKIMAL TALI PUSAT DAN
SEL PUNCA HEMATOPOITIK CD34⁺ DARAH TEPI
TALASEMIA MAYOR
(PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS)**

MOCHAMAD SYAIFUDIN

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

**RESPON *GRAFT VERSUS HOST DISEASE* (GvHD) PADA KO-
KULTIVASI SEL PUNCA MESENKIMAL TALI PUSAT DAN
SEL PUNCA HEMATOPOITIK CD34⁺ DARAH TEPI
TALASEMIA MAYOR
(PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS)**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor

Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor

Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

telah dipertahankan di hadapan

Panitia Ujian Doktor Terbuka

Pada hari : Selasa

Tanggal : 23 Maret 2021

Pukul : 10.00-12.00 WIB

Oleh:

**MOCHAMAD SYAIFUDIN
011617017320**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

**RESPON *GRAFT VERSUS HOST DISEASE* (GVHD) PADA KO-
KULTIVASI SEL PUNCA MESENKIMAL TALI PUSAT DAN SEL
PUNCA HEMATOPOITIK CD34⁺ DARAH TEPI TALASEMIA MAYOR
(PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS)**

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 23 MARET 2021

Oleh

Promotor

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., M.Si
NIP. 195910031987011001

Kopromotor I

Prof. Dr. I Dewa Gede Ugrasena, dr., Sp.A (K)
NIP. 195612211985021001

Kopromotor II

Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., Sp.OT(K)
NIP. 196411151990031001

**Naskah Disertasi ini telah diuji dan dinilai
Oleh panitia penguji Ujian Akhir Disertasi Tahap 2 (Terbuka)
Pada tanggal 23 Maret 2021**

Panitia penguji. :

Ketua : 1. Dr. Ninik A. Soemyarso, dr., Sp.A(K)., MMPaed

Anggota. : 2. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., M.Sc
3. Prof. Dr. I Dewa Gede Ugrasena, dr., Sp.A(K)
4. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., Sp.OT(K)
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
6. Dr. Ferdiansyah, dr., Sp.OT(K)
7. Dr. Heri Suroto, dr., Sp.OT(K)
8. Dr. Hari Basuki, dr., M.Kes

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 1030/UN3.1.1/DL/2021
Tanggal : 10 Februari 2021**

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Robbil ‘Alamin, segala puji bagi Allah Subhanallahu wa ta’ala, atas segala rahmat, karunia dan hidayahNya sehingga disertasi ini dapat terselesaikan. Tidak lupa sholawat serta salam saya sampaikan kepada Nabi Muhammad Shalallahu’alaihi Wasallam.

Disertasi ini dapat selesai tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran, koreksi dari Promotor, Ko Promotor dan Tim Penguji. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, saya ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., M.Sc sebagai pembimbing akademik dan promotor saya, yang telah membimbing dengan tulus ikhlas, penuh pengertian, perhatian dan kesabaran, memberikan semangat, motivasi, arahan dan wawasan serta berdiskusi mengenai berbagai hambatan dalam masa studi saya serta meluangkan waktu untuk berkonsultasi sehingga disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik. Saya menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Prof. Dr. I Dewa Ugrasena, dr., Sp.A-KHOM sebagai Ko Promotor I yang dengan penuh kesabaran dan pengertian memberikan saya bimbingan dan arahan, di sela jadwal beliau yang padat, sebagai Kepala Departemen Hematooncology Anak RSUD Dr. Soetomo. Beliau juga memberikan banyak bantuan, motivasi, dan dukungan dalam proses penelitian disertasi saya. Saya menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada beliau.

Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., Sp.OT(K) sebagai Ko Promotor II yang dengan penuh semangat dan keteduhan memberikan saya semangat, bimbingan dan arahan penelitian ini, di sela jadwal beliau yang padat sebagai kepala Departemen Ortopedi RSUD Dr. Soetomo. Beliau juga memberikan banyak bantuan, motivasi, dan dukungan dalam proses penelitian disertasi saya. Saya menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada beliau.

Dengan selesainya disertasi ini perkenankanlah pula saya menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Prof. Dr. M. Nasih, S.E, MT, Ak., selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan studi pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan studi pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG (K) selaku Koordinator Program Studi (KPS) Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas dan dukungan kepada saya selama menjalani dan menyelesaikan pendidikan doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Tim Penguji Materi Kualifikasi, Proposal, dan Ujian Akhir Disertasi Tahap I (Tertutup) yang telah banyak meluangkan waktunya ditengah kesibukan Beliau sebagai Wakil Rektor I Universitas Brawijaya, Malang.

Dr. Ninik A. Soemyarso, dr., Sp.A (K), MMPaed selaku Tim Penguji Materi Kualifikasi, Proposal, Kelayakan, dan Ketua Tim Penguji Ujian Akhir Disertasi Tahap I (Tertutup) yang telah banyak meluangkan waktu dan perhatiannya di tengah kesibukan Beliau.

Dr. Ferdiansyah, dr., Sp.OT (K) selaku Tim Penguji Materi Kualifikasi, Proposal, Kelayakan, dan Ujian Akhir Disertasi Tahap I (Tertutup) yang telah banyak meluangkan waktunya di tengah kesibukan Beliau.

Dr. Heri Suroto, dr., Sp.OT (K) selaku Tim Penguji Materi Kualifikasi, Proposal, Kelayakan, dan Ujian Akhir Disertasi Tahap I (Tertutup) yang telah banyak meluangkan waktunya di tengah kesibukan beliau.

Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes selaku Tim Penguji Materi Kualifikasi, Proposal, Kelayakan, dan Ujian Akhir Disertasi Tahap I (Tertutup). Beliau juga telah memberikan banyak bimbingan dan saran metodologi penelitian, analisis data serta interpretasinya di tengah kesibukan beliau yang luar biasa padat.

Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed., Ph.D, di Laboratorium Biokimia-Biomolekular Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas bantuannya dan waktu yang diberikan kepada saya, khususnya bantuan teknis pekerjaan laboratorium terhadap pengamatan Elisa dan Imunositokimia, dalam penelitian dan penyelesaian disertasi ini.

Aristika Dinaryanti, drh., M.Si, di Laboratorium Pusat Penelitian dan Pengembangan *Stem Cell* Universitas Airlangga Surabaya atas bantuannya dan waktu yang diberikan kepada saya, khususnya bantuan teknis pekerjaan laboratorium isolasi, kultur dan karakterisasi sel punca hematopoietik CD34⁺ dan sel T, sehingga penelitian dan disertasi ini dapat selesai.

Para dosen Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang sangat saya hormati: Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS, Prof. Dr. Harjanto J M, dr., AIF (alm), Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD, Prof. Soetjipto, dr., MS., PhD, Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr., MS, Prof. Dr. Indri Safitri Mukono, dr., MS, Prof. Dr. Suhartati, dr., MS, Prof. Dr. Suryo Hudoyo, dr., Sp.BK, Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., MSi, Prof. Dr. Aryati, dr., MS., SpPK(K), Prof. Dr. Yoes Prijatna Dahlan, dr., MSc., Sp.ParK, Prof. Dr. Zainuddin, Apt, Widodo JP, dr., MS., MPH., DrPH, Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., MKes, Dr. Florentina Sustini, dr., MS, Dr. Soenaryo, dr., MS., M.Sc, Dr. Hj. Susilowati Andajani, dr., MS, dan Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes, yang telah memberikan pengetahuan, sikap, dan praktek yang sangat bermanfaat bagi penelitian saya.

Rekan-rekan dan sejawat S3 Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Angkatan 2016 terutama *The three musketeers* Dr. Arif Rachman, drg., MM., MH., MTr.Hanla., Sp.Pros, Dr. Bimo Sasono, dr., Sp.OT(K), dan semuanya yang selalu saling memberikan perhatian dan dukungan selama kuliah maupun penelitian, saya haturkan banyak terima kasih.

Seluruh staf dan karyawan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga atas segala kerjasama dan bantuan yang telah diberikan kepada saya selama menempuh pendidikan. Seluruh teman seperjuangan peserta Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga angkatan 2016 atas segala keakraban, kerja sama, kekompakan dan saling memotivasi, memberi semangat serta saling memberi masukan dalam menempuh pendidikan S3.

Rasa terima kasih, hormat dan lantunan do'a tiada putus, juga saya tujukan untuk kedua orang tua saya, H.Ramelan (alm.) dan Siti Zunifah (alm.), Ayah mertua saya Usman Dimiyati (alm.) dan Ibu mertua saya Ummu Zuhroh (alm.). Rasa terima kasih dan penghargaan juga saya sampaikan kepada istri saya tercinta Farida Usmandita yang selalu memberikan dukungan dalam suka dan duka, memotivasi saya untuk segera menyelesaikan studi. Terima kasih dan kasih sayang juga untuk para anak-anakku tersayang Itmamul Wafa, S.M, Atina Izzah Ar Rahma. S.E., MARS, dr. Fathiyah Muazzaroh, Mochamad Wildan, S.Ked dan Sayyidah Thalia Adenia, anak menantuku dr. Bimantoro Widhi Prasetyo dan Askia Sani, S.Kom, yang selalu memberikan do'a, semangat dan dukungan selama studi ini. Tidak lupa ucapan terima kasih pujangga hati, saya sampaikan untuk kedua cucu yang aku sayangi Muhammad Zayn Al Fatih dan Kiara Aliya Khanza yang selalu memberikan semangat, pancaran do'a dan dukungan selama ini. Semoga perjuangan menyelesaikan studi S3 pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga ini dapat menjadi motivasi anggota keluarga untuk belajar dan mengejar cita-cita tak lekang oleh waktu.

Kepada semua pihak yang belum dapat disebutkan satu persatu, saya mohon maaf yang sebesar-besarnya. Untuk itu saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat pada semua

pihak yang telah ikut terlibat memberikan dorongan, semangat dan doa restu selama saya menempuh pendidikan dari awal sampai selesainya disertasi ini.

Sebagai manusia tentunya tidak ada yang sempurna, untuk berbagai kesalahan dan kekurangan berkaitan dengan pelaksanaan pendidikan Program Studi Pendidikan Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, maka dari lubuk hati yang terdalam saya mohon maaf yang sebesar-besarnya kepada Promotor, Ko-promotor, para dosen, semua staf administrasi, dan semua pihak.

Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat dalam pengembangan Ilmu Pengetahuan, terutama untuk penderita Talasemia dan disiplin ilmu lainnya. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmatNya kepada kita semua.

Saya menyadari bahwa disertasi ini masih banyak kekurangan karena keterbatasan peneliti, untuk itu masukan dan saran yang bersifat membangun sangat diperlukan untuk menyempurnakan penelitian disertasi ini

Surabaya, 8 Maret 2021

Penulis

RINGKASAN

Masalah utama yang terjadi dalam terapi cangkok sumsum tulang penderita talasemia beta mayor di dunia saat ini adalah reaksi penolakan atau *Graft versus Host Disease* (GvHD). Komponen yang bertanggung jawab atas kejadian GvHD adalah gen HLA donor (Petersdorf, 2017) dan sel limfosit T inang (Abbas, 2016). Angka kejadian GvHD akut global adalah hingga 50% pada pasien *hematopoietic stem cell transplantation* (HSCT) (Choudhary et al., 2019) dengan angka mortalitas lebih 10% (Vaillant et al., 2020). Gen pembawa talasemia mayor di Indonesia berkisar 3-10%, atau setiap tahun lahir 2500 bayi lahir dengan talasemia mayor (Menkes, 2018).

Prinsip menghambat respon GvHD adalah dengan memberikan gen HLA-G kelas 1b non klasik yang tidak dikenali inang (Rebmann et al., 2014) dan menekan perkembangan limfosit T CD4⁺, CD8⁺ (Sauls et al., 2020). HLA-G banyak ditemukan di permukaan *membrane mesenchymal stem cell* (MSC) tali pusat manusia (Ding et al., 2016). HLA-G menyandi 7 bentuk molekul yaitu HLA-G1, -G2, -G3, -G4 yang terikat di *membrane* (mHLA-G) dan HLA-G5, -G6, dan HLA-G7 yang larut di sitoplasma, *soluble* (sHLA-G) (Moreau et al., 2002). Selain molekul HLA-G yang bersifat immunosupresif, MSC yang diaktifasi oleh sel limfosit T, akan mengekspresikan molekul immunosupresif IL-10, TGFβ, PGE2, IDO (Manrreza and Montesinos, 2014). MSC dapat menginduksi diferensiasi progenitor sel punca hematopoietik CD34⁺ menjadi populasi DC regulator, yang pada gilirannya akan merangsang generasi Foxp3 Treg dan menghambat maturasi *dendritic cell* (mDC) tetap dalam kondisi *immature dendritic cell* (iDC) (Manrreza and Montesinos, 2014). Berbagai jalur efektor imun di atas baik independen maupun dependen akan menghambat proliferasi sel T CD4⁺ dan CD8⁺ sehingga menekan terjadinya GvHD (Assman et al., 2021).

Tujuan penelitian ini adalah menjelaskan pemberian ko-kultivasi sel punca mesenkimal tali pusat (MSC) dan sel punca hematopoietik CD34⁺ darah tepi terhadap respon *Graft versus Host Disease* (GvHD) pada cangkok sumsum tulang penderita talasemia mayor. Menganalisis perubahan ekspresi IL-10, TGFβ, PGE2, IDO dengan pemeriksaan Elisa dan sekresi HLA-G, Foxp3, CD4⁺, dan CD8⁺ dengan pemeriksaan Imunositokimia. Manfaat penelitian ini secara akademis memberikan kontribusi teori ko-kultivasi sel punca mesenkimal tali pusat dan sel punca hematopoietik CD34⁺ darah tepi terhadap respon GvHD, sedangkan manfaat praktisnya adalah memberikan alternatif peningkatan efikasi dalam pencegahan respon GvHD baik pada penelitian preklinik *in-vitro* maupun *in-vitro* dan uji klinik.

Hipotesa penelitian ini adalah pemberian ko-kultivasi sel punca mesenkimal tali pusat dan sel punca hematopoietik CD34⁺ dapat meningkatkan ekspresi IL-10, TGFβ, PGE2, IDO, sekresi HLA-G, dan Foxp3, dan dapat menurunkan jumlah sel limfosit CD4⁺ dan CD8⁺.

Hasil penelitian ini, dapat diringkas sebagai berikut: (1) pemberian ko-kultivasi sel punca mesenkimal tali pusat dan sel punca hematopoietik CD34⁺ dapat meningkatkan ekspresi IL-10, TGFβ, PGE2, dan IDO sejak jam 12 hingga jam 24 secara signifikan ($p < 0,05$); (2) meningkatkan sekresi HLA-G secara signifikan ($p < 0,05$); (3) meningkatkan sekresi Foxp3 secara signifikan

($p < 0,05$); (4) menurunkan sekresi sel limfosit CD4 dan CD8 secara signifikan ($p < 0,05$).

Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa pemberian ko-kultivasi sel punca mesenkimal MSC dan sel punca hematopoietik CD34⁺ pada kultur sel limfosit T mampu menurunkan reaksi GvHD.

SUMMARY

The main problem that occurs in bone marrow transplant therapy in patients with beta thalassemia major in the world today is the response reaction or Graft versus Host Disease (GvHD). The components responsible for the incidence of GvHD are the donor HLA gene (Petersdorf, 2017) and host T lymphocytes (Abbas, 2016). The incidence of global acute GvHD is up to 50% in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) patients (Choudhary et al., 2019) with a mortality rate of more than 10% (Vaillant et al., 2020). Genes carrying thalassemia major in Indonesia range from 3-10%, or every year 2,500 babies are born with thalassemia major (Menkes, 2018).

The principle of inhibiting the GvHD response is to provide non-classical HLA-G class 1b genes that are not recognized by the host (Rebmann et al., 2014) and suppress the development of CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes (Sauls et al., 2020). HLA-G is found on the surface of the human umbilical cord mesenchymal stem cell (MSC) membrane (Ding et al., 2016). HLA-G encodes 7 molecular forms, namely HLA-G1, -G2, -G3, -G4 membrane-bound (mHLA-G) and HLA-G5, -G6, and HLA-G7 dissolved in the cytoplasm, soluble (sHLA-G) (Moreau et al., 2002). In addition to the HLA-G molecule which is immunosuppressive, MSC, which is activated by T lymphocytes, will express immunosuppressive molecules IL-10, TGFβ, PGE2, IDO (Manrreza and Montesinos, 2014). MSC induces differentiation of CD34⁺ hematopoietic stem cell progenitors into regulatory DC populations, which in turn can generate the Foxp3 Treg and inhibit the maturation of dendritic cells (mDC) that remain in immature dendritic cell (iDC) conditions (Manrreza and Montesinos, 2014). The various immune effector pathways, both independent and dependent, will inhibit the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, causing GvHD (Assman et al., 2021). The aim of this study was to explain the co-cultivation of mesenchymal cord stem cells (MSC) and hematopoietic stem cells CD34⁺ peripheral blood to the response of Graft versus Host Disease (GvHD) in bone marrow grafts in thalassemia major patients. Analyze changes in expression of IL-10, TGFβ, PGE2, IDO by examining Elisa and secretion of HLA-G, Foxp3, CD4⁺, and CD8⁺ by immunocytochemistry examination. The academic benefit of this study is to contribute to the co-cultivation theory of cord mesenchymal stem cells and peripheral blood CD34⁺ hematopoietic stem cells to the GvHD response, while its practical benefit is to provide an alternative to increasing the efficacy in preventing GvHD responses in both in-vitro and in-vitro preclinical studies and clinical trials.

The hypothesis of this study is that co-cultivation of mesenchymal cord stem cells and CD34⁺ hematopoietic stem cells can increase the expression of IL-10, TGFβ, PGE2, IDO, secretion of HLA-G, and Foxp3, and can reduce the number of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes.

The results of this study can be summarized as follows: (1) the co-cultivation of mesenchymal stem cells and CD34⁺ hematopoietic stem cells can significantly increase the expression of IL-10, TGFβ, PGE2, and IDO from 12 hours to 24 hours. (<0.05); (2) increased HLA-G secretion significantly (p <0.05); (3) increased Foxp3 secretion significantly (p <0.05); (4) decreased the secretion of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes significantly (p <0.05).

The conclusion of this study is that co-cultivation of MSC mesenchymal stem

cells and CD34⁺ hematopoietic stem cells in T lymphocyte culture can reduce the GvHD response.

Abstract

Graft Versus Host Disease Response in Co-cultivation of Mesenchymal Stem Cell and CD34⁺ Hematopoietic Stem Cell of Major Thalassemia

Background. The main problem in the implementation of bone marrow transplantation (BMT) in patients with thalassemia major in the world today is graft versus host disease (GvHD). One of the causes is incompatibility of the donor's human leucocyte antigen (HLA) with recipient T lymphocytes. The gene that plays the most role in this GvHD reaction is the donor human leucocyte antigen (HLA), and the HLA which has immunosuppressive properties is the non-classical class 1b HLA-G. HLA-G is found on the surface of mesenchymal stem cell (MSC) membranes. MSC when activated with T lymphocytes, will secrete immunosuppression molecules, HLA-G and forkhead box protein 3 (Foxp3), and express interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor β (TGF β), prostaglandin E2 (PGE2), and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). MSC will induce CD34⁺ hematopoietic stem cells to keep dendritic cells (DC) in immature (iDC) state which will strengthen the inhibition against the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, thereby reducing the GvHD reaction.

Methods. The research design was carried out as an experimental pre-posttest only control group design (in-vitro). T lymphocytes cultured from peripheral blood of children with thalassemia major were exposed to MSC and CD34⁺ hematopoietic stem cells from sibling donor. The experimental unit was divided into 4 groups: (1) The positive control group, untreated T lymphocytes, (2) T lymphocytes exposed to MSC, (3) T lymphocytes exposed to CD34⁺ hematopoietic stem cells, (4) T lymphocytes exposed to co-cultivation of MSC-CD34⁺. Elisa examination of IL-10, TGF β , PGE2, IDO secretion and immunocytochemistry examination of the expression of HLA-G, Foxp3, CD4⁺, and CD8⁺ were done at 0, 12, and 24 hours incubation time.

Results. Co-cultivation of MSC-CD34⁺ stem cells in T lymphocyte culture was able to increase the secretion of IL-10, TGF β , PGE2, IDO, HLA-G and Foxp3 significantly ($p < 0.05$) at 12 and 24 hours. CD34⁺ hematopoietic stem cells and MSC-CD34⁺ stem cell co-cultivation were able to significantly reduce CD4⁺ expression ($p < 0.05$) at 12 and 24 hours. Furthermore, MSC and MSC-CD34⁺ stem cell co-cultivation were able to reduce CD8⁺ expression significantly ($p < 0.05$) at 24 hours.

Conclusions. Co-cultivation of MSC-CD34⁺ hematopoietic stem cells in T lymphocyte culture was able to reduce the GvHD reaction.

Keywords: BMT Thalassemia, MSC umbilical cord mesenchymal stem cells, CD34⁺ hematopoietic stem cells, IL-10, TGF β , PGE2, IDO, HLA-G, Foxp3, CD4⁺, CD8⁺.

Promotor,



Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., M.Sc

DAFTAR ISI

Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Halaman Awal Disertasi.....	iii
Lembar Prasarat Gelar Doktor pada Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka).....	iv
Lembar Pengesahan.....	v
Lembar Penetapan Panitia Penguji Ujian Tahap 1 (Tertutup).....	vi
Lembar Ucapan Terima Kasih.....	vii
Ringkasan.....	xii
<i>Summary</i>	xiv
ABSTRAK.....	xvi
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xxi
DAFTAR GAMBAR.....	xxii
DAFTAR ARTI LAMBANG, SINGKATAN DAN ISTILAH.....	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxix

BAB 1	PENDAHULUAN	
1.1	Latar Belakang.....	1
1.2	Rumusan Masalah.....	5
1.3	Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1	Tujuan Umum.....	5
1.3.2	Tujuan Khusus.....	6
1.4	Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1	Manfaat Akademik.....	6
1.4.2	Manfaat Praktis.....	6
BAB 2	TINJAUAN PUSTAKA	
2.1	Talasemia.....	8
2.2	Talasemia Mayor	9
2.3	Talasemia Minor	11
2.4	Sel Punca	11
2.4.1	Sel Punca Mesenkimal	13
2.4.2	Sel Punca Hematopoietik CD34 ⁺	16
2.4.3	Niche	16
2.5	<i>Graft versus Host Disease</i> (GvHD).....	17
2.6	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (HLA).....	18
2.7	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (HLA-G).....	19
2.8	<i>Forkhead box protein 3</i> (Foxp3).....	21
2.9	<i>Cluster Differentiation 4</i> (CD4 ⁺)	23
2.10	<i>Cluster Differentiation 8</i> (CD8 ⁺)	24
2.11	Interleukin-10 (IL-10).....	25
2.12	<i>Transforming Growth Factor-β</i> (TGF- β).....	25

2.13	<i>Prostaglandin E2 (PGE2)</i>	26
2.14	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)</i>	27
2.15	Respon Imun Jaringan Cangkak.....	27
2.16	Regulasi Imun Sel Punca Mesenkimal pada Sel Limfosit T...	28
2.17	Regulasi Imun Sel Punca Mesenkimal pada Sel Imun.....	29
2.18	Sumsum Tulang.....	30
2.19	Cangkak Sumsum Tulang.....	31
2.20	Cangkak sumsum tulang pada talasemia mayor.....	33
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1	Kerangka Konseptual.....	37
3.2	Penjelasan Kerangka Konseptual Penelitian.....	38
3.3	Hipotesis Penelitian.....	39
BAB 4	METODE PENELITIAN	
4.1	Rancangan Penelitian.....	40
4.2	Unit Eksperimen.....	41
4.3	Replikasi dan Randomisasi.....	41
4.4	Variabel Penelitian.....	43
4.4.1	Variabel Bebas.....	43
4.4.2	Variabel Antara.....	43
4.4.3	Variabel Terikat.....	43
4.4.4	Variabel Kendali.....	44
4.4.5	Definisi Operasional Variabel.....	44
4.5	Materi Penelitian.....	48
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	48
4.7	Langkah Penelitian.....	49
4.7.1	Uji Laik Etik Penelitian.....	49
4.7.2	Prosedur Penelitian Tahap (isolasi, kultur, karakterisasi dan uji toksisitas sel punca)	49
4.7.2.1	Prosedur Pengambilan Tali Pusat.....	49
4.7.2.2	Prosedur Isolasi dan Kultur Ekspansi Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat	50
4.7.2.3	Karakterisasi dan Diferensiasi Fenotip Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat dan Sel Punca Hematopoitik CD34 ⁺	52
4.7.2.4	Pemeriksaan Imunositokimia	54
4.7.2.5	Pemeriksaan Flowcytometry.....	55
4.7.2.6	Pemeriksaan ELISA	56
4.7.2.7	Pemeriksaan Kadar IL-10, IDO, PGE2, dan TGFβ.....	56
4.7.2.8	Pemeriksaan Kadar CD4, CD8, HLA-G dan Foxp3.....	57
4.8	Bahan Isolasi dan Kultur	58
4.8.1	Bahan Isolasi dan Kultur CD34 ⁺	58
4.8.2	Protokol Isolasi CD34 ⁺	60
4.8.3	Bahan Isolasi Kultur Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat	61
4.8.4	Bahan Isolasi Sel T.....	62

4.8.5	Protokol Isolasi sel limfosit T.	62
4.8.6	Bahan Pemeriksaan Parameter Penelitian ELISA.....	63
4.8.7	Bahan Pemeriksaan Penelitian Imunositokimia	63
4.8.8	Alat Penelitian	63
4.8.9	Perhitungan Sel dan Penentuan Jumlah Sel Hidup	65
4.8.10	Penyimpanan sel	66
4.9	Analisis Data.....	66
4.10	Skema Tahapan Penelitian.....	68
BAB 5	HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN	
5	Data Penelitian.....	70
5.1	Data material penelitian.....	71
5.1.2	Karakterisasi sel punca hematopoitik CD34 ⁺	72
5.1.3	Karakterisasi sel T.....	73
5.2	Hasil dan analisis kadar IL-10, TGF- β , PGE2, IDO, ekspresi HLA-G, Foxp3, CD4 ⁺ , CD8 ⁺	74
5.2.1	Kadar IL-10.....	74
5.2.2	Kadar TGF- β	75
5.2.3	Kadar PGE2.....	77
5.2.4	Kadar IDO.....	78
5.2.5	Ekspresi HLA-G.....	80
5.2.6	Ekspresi Foxp3.....	82
5.2.7	Ekspresi CD4 ⁺	84
5.2.8	Ekspresi CD8 ⁺	86
5.2.9	Mekanisme Efek Pemberian MSC	89
5.2.10	Mekanisme Efek Pemberian CD34 ⁺	90
5.2.11	Mekanisme Efek Pemberian MSC-CD34 ⁺	91
5.2.12	Efek perlakuan terhadap kadar IL-10, TGF- β , PGE2, IDO, ekspresi HLA-G, dan ekspresi Foxp3.....	92
5.2.13	Efek perlakuan terhadap ekspresi CD4 ⁺	93
5.2.14	Efek perlakuan terhadap ekspresi CD8 ⁺	93
BAB 6	PEMBAHASAN	
6.1	Analisis data material penelitian.....	94
6.1.1	Analisis karakterisasi sel punca mesenkimal tali pusat.....	94
6.1.2	Analisis karakterisasi sel punca hematopoitik CD34 ⁺	94
6.1.3	Analisis karakterisasi sel T.....	95
6.2	Analisis kadar IL-10, TGF- β , PGE2, IDO, ekspresi HLA-G, Foxp3, CD4 ⁺ , CD8 ⁺	95
6.2.1	Kadar IL-10.....	95
6.2.2	Kadar TGF- β	97
6.2.3	Kadar PGE2.....	98
6.2.4	Kadar IDO.....	99
6.2.5	Ekspresi HLA-G.....	100
6.2.6	Ekspresi Foxp3.....	102
6.2.7	Ekspresi CD4 ⁺	103
6.2.8	Ekspresi CD8 ⁺	104
6.3	Pemberian ko-kultivasi MSC- CD34 ⁺ menghambat	

	penolakan graft (<i>Novelty</i>).....	106
BAB 7	PENUTUP	
7.1	Kesimpulan.....	108
7.2	Saran.....	108
	DAFTAR PUSTAKA.....	109
	LAMPIRAN.....	118

DAFTAR TABEL

Tabel 2.15	Fitur jalur pengolahan antigen	28
Tabel 2.20.1	Hasil HSCT talasemia beta mayor dari donor HLA- <i>matched</i>	35
Tabel 2.20.2	Faktor risiko Pesaro dan kelas risiko BMT talasemia	35
Tabel 5.2.1	Perbedaan kadar IL-10 antar kelompok dan waktu pengamatan	74
Tabel 5.2.2	Perbandingan kadar TGF- β antar kelompok dan waktu pengamatan	75
Tabel 5.2.3	Perbandingan kadar PGE2 antar kelompok dan waktu pengamatan	77
Tabel 5.2.4	Perbandingan kadar IDO antar kelompok dan waktu pengamatan	78
Tabel 5.2.5	Perbandingan ekspresi HLA-G antar kelompok dan waktu pengamatan	81
Tabel 5.2.6	Perbandingan ekspresi Foxp3 antar kelompok dan waktu pengamatan	83
Tabel 5.2.7	Perbandingan ekspresi CD4 ⁺ antar kelompok dan waktu pengamatan	85
Tabel 5.2.8	Perbandingan ekspresi CD8 ⁺ antar kelompok dan waktu pengamatan	87
Tabel 5.2.12	Efek perlakuan terhadap kadar IL-10, TGF- β , PGE2, IDO, ekspresi HLA-G, dan ekspresi Foxp3	92
Tabel 5.2.13	Efek perlakuan MSC, CD34 ⁺ , MSC-CD34 ⁺ terhadap ekspresi CD4 ⁺	93
Tabel 5.2.14	Efek perlakuan MSC, CD34 ⁺ , MSC-CD34 ⁺ terhadap ekspresi CD8 ⁺	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.4.3	Skema diagram dari sel punca <i>niche</i>	17
Gambar 2.6.1	Struktur molekul HLA kelas I dan II	19
Gambar 2.6.2	Lokasi dan organisasi gen HLA pada kromosom nomer	19
Gambar 2.7	Molekul HLA-G	20
Gambar 2.8	Sifat supresi alami dari sel Treg	23
Gambar 2.16	Regulasi imun sel punca mesenkimal pada limfosit T	29
Gambar 2.17	Regulasi imun sel punca mesenkimal pada sel imun	30
Gambar 2.18	Mekanisme eritropoiesis inefektif dan hemolisis	31
Gambar 3.1	Kerangka konsep	37
Gambar 4.1	Skema rancangan penelitian <i>In Vitro</i>	40
Gambar 4.10	Skema tahapan penelitian	68
Gambar 5.1.1	Karakterisasi sel punca mesenkimal tali pusat (MSC)	72
Gambar 5.1.2	Karakterisasi sel punca hematopoietik CD34 ⁺	73
Gambar 5.1.3	Karakterisasi Sel T	73
Gambar 5.2.1	Diagram perbedaan kadar IL10 antar kelompok dan waktu pengamatan	75
Gambar 5.2.2	Diagram perbandingan kadar TGF- β antar kelompok dan waktu pengamatan	76
Gambar 5.2.3	Diagram perbandingan kadar PGE2 antar kelompok dan waktu pengamatan	78
Gambar 5.2.4	Diagram perbandingan kadarIDO antar kelompok dan waktu pengamatan	79

Gambar 5.2.5.1 Diagram perbandingan ekspresi HLA-G antar kelompok dan waktu pengamatan (imunositokimia)	80
Gambar 5.2.5.2 Diagram perbandingan ekspresi HLA-G antar kelompok dan waktu pengamatan (<i>multiple comparisons</i> LSD)	82
Gambar 5.2.6.1 Diagram perbandingan ekspresi Foxp3 antar kelompok dan waktu pengamatan (imunositokimia)	82
Gambar 5.2.6.2 Diagram perbandingan ekspresi Foxp3 antar kelompok dan waktu pengamatan (<i>multiple comparisons</i> LSD)	84
Gambar 5.2.7.1 Diagram perbandingan ekspresi CD4 ⁺ antar kelompok dan waktu pengamatan (imunositokimia)	84
Gambar 5.2.7.2 Diagram perbandingan ekspresi CD4 ⁺ antar kelompok dan waktu pengamatan (<i>multiple comparisons</i> LSD)	86
Gambar 5.2.8.1 Diagram perbandingan ekspresi CD8 ⁺ antar kelompok dan waktu pengamatan (imunositokimia)	86
Gambar 5.2.8.2 Diagram perbandingan ekspresi CD8 ⁺ antar kelompok dan waktu pengamatan (<i>multiple comparisons</i> LSD)	88
Gambar 5.2.9 Diagram analisis jalur mekanisme efek pemberian MSC	89
Gambar 5.2.10 Diagram analisis jalur mekanisme efek pemberian CD34 ⁺	90
Gambar 5.2.11 Diagram analisis jalur mekanisme efek pemberian MSC-CD34 ⁺	91

DAFTAR ARTI LAMBANG, SINGKATAN DAN ISTILAH

AIDS	: <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	: <i>cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD105	: <i>Cluster of Differentiation 105</i>
CD11b	: <i>Cluster of Differentiation 11b</i>
CD13	: <i>Cluster of Differentiation 13</i>
CD133	: <i>Cluster of Differentiation 133</i>
CD14	: <i>Cluster of Differentiation 14</i>
CD19	: <i>Cluster of Differentiation 19</i>
CD25	: <i>Cluster of Differentiation 25</i>
CD34	: <i>Cluster of Differentiation 34</i>
CD34 ⁺	: <i>Cluster of Differentiation 34 positive</i>
CD37	: <i>Cluster of Differentiation 37</i>
CD4 ⁺	: <i>Cluster of Differentiation 4 positive</i>
CD69	: <i>Cluster of Differentiation 69</i>
CD79 α	: <i>Cluster of Differentiation 79α</i>
CD8	: <i>Cluster of Differentiation 8</i>
CD8 ⁺	: <i>Cluster of Differentiation 8 positive</i>
CD11b	: <i>Cluster of Differentiation 11b</i>
CD45	: <i>Cluster of Differentiation 45</i>
CD73	: <i>Cluster of Differentiation 73</i>
CD79 α	: <i>Cluster of Differentiation 79α</i>
CD90	: <i>Cluster of Differentiation 90</i>
CD105	: <i>Cluster of Differentiation 105</i>
CD133	: <i>Cluster of Differentiation 133</i>
CST	: <i>Cangkok Sumsum Tulang</i>
CTL CD8	: <i>Cytotoxic T Lymphocyte Cluster Differentiation 8</i>
CTLA-4	: <i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DAB	: <i>3,3'Diaminobenzidine</i>

DC	: <i>Dendritic Cell</i>
DH ₂ O	: <i>Distilled Water</i>
Dil- Ac-LDL	: <i>1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-Acetylated Low Density Lipoprotein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-LG	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose</i>
DMEM/F12	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
EBMT	: <i>European Group of Bone Marrow Transplantation</i>
ECGF	: <i>Endothelial Cell Growth Factor</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPC	: <i>Endothelial Progenitor Cell</i>
FACS	: <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FBA	: <i>Fetal Bovine Albumin</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
Foxp3	: <i>Forkhead Box P3</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GH	: <i>Growth Hormone</i>
GvHD	: <i>Graft versus Host Disease</i>
H ₂ SO ₄	: <i>Hydrogen Sulphate</i>
HbA	: <i>Hemoglobin A</i>
HbA ₂	: <i>Hemoglobin A₂</i>
HbF	: <i>Hemoglobin F</i>
HBSS	: <i>Hank Balance Salt Solution</i>
HCV	: <i>Hepatitis C Virus</i>
hEGF	: <i>Human Epidermal Growth Factor</i>
HEPES	: <i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HLA	: <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HLA-A	: <i>Human Leucocyte Antigen-A</i>
HLA-B	: <i>Human Leucocyte Antigen-B</i>

HLA-C	: <i>Human Leucocyte Antigen-C</i>
HLA-DR	: <i>Human Leucocyte Antigen-DR</i>
HLA-E	: <i>Human Leucocyte Antigen-E</i>
HLA-F	: <i>Human Leucocyte Antigen-F</i>
HLA-G	: <i>Human Leucocyte Antigen-G</i>
HLA-G1	: <i>Human Leucocyte Antigen-G1</i>
HLA-G1s	: <i>Human Leucocyte Antigen-G shedding</i>
HLA-G2	: <i>Human Leucocyte Antigen-G2</i>
HLA-G3	: <i>Human Leucocyte Antigen-G3</i>
HLA-G4	: <i>Human Leucocyte Antigen-G4</i>
HLA-G5	: <i>Human Leucocyte Antigen-G5</i>
HLA-G6	: <i>Human Leucocyte Antigen-G6</i>
HLA-G7	: <i>Human Leucocyte Antigen-G7</i>
HLA-H	: <i>Human Leucocyte Antigen-H</i>
HO-1	: <i>Heme Oxygenase-1</i>
HRP	: <i>Horseradish Peroxidase</i>
HSCT	: <i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
HUCMSC	: <i>Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell</i>
ICC	: <i>Immunocytochemistry</i>
iDC	: <i>immature Dendritic Cell</i>
IDO	: <i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN-gamma	: <i>Interferon Gamma</i>
IFN γ	: <i>Interferon γ</i>
IL-10	: <i>Interleukin 10</i>
IL-35	: <i>Interleukin 35</i>
ILC	: <i>Innate Lymphoid Cells</i>
ILT	: <i>Immunoglobulin Like Transcript</i>
ILT2	: <i>Immunoglobulin Like Transcript 2</i>
ILT4	: <i>Immunoglobulin Like Transcript 4</i>
KIR2DL4	: <i>Killer like Inhibitor Receptor Domain Tail 4</i>
LIF	: <i>Leukemia</i>
LSM	: <i>Lymphocyte Separation Medium</i>

M199	: <i>Medium 199</i>
mDC	: <i>mature Dendritic Cell</i>
MEM	: <i>Modified Eagle Medium</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mHLA-G	: <i>membrane Human Leucocyte Antigen-G</i>
mHLA-G	: <i>soluble Human Leucocyte Antigen-G</i>
MLC	: <i>Mixed Lymphocyte Culture</i>
MNC	: <i>Mononuclear Cell</i>
MRD	: <i>Matched Related Donor</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MSD	: <i>Matched Sibling Donor</i>
MUD	: <i>Matched Unrelated Donor</i>
NA	: <i>Not Available</i>
NBMDR	: <i>National Bone Marrow Donor Registry Program</i>
NK Cell	: <i>Natural Killer Cell</i>
OS	: <i>Overall Survival</i>
PBMC	: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PLA2	: <i>Phospholipase A2</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
sHLA-G	: <i>soluble Human Leucocyte Antigen-G</i>
sHLA-G	: <i>Transmembrane Human Leucocyte Antigen-G</i>
SCD	: <i>Sickle Cell Disease</i>
TCR:	: <i>T Cell Receptor</i>
T-reg	: <i>Regulatory T Cell</i>
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TFR	: <i>Thalassemia Free Survival</i>
TMB	: <i>Tetra Methyl Benzidine</i>
TNF-alfa	: <i>Tumor Necrosis Factor alfa</i>
Tr1	: <i>Type 1 Regulatory T Cell</i>
UCB	: <i>Umbilical Cord Blood</i>

WFI : *Water For Injection*

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Format Hasil Laporan.....	115
Lampiran 2 Jadwal Kegiatan Penelitian.....	116
Lampiran 3 <i>Information for Consent</i>	117
Lampiran 4 <i>Informed Consent</i>	122
Lampiran 5 Skema Tahapan Penelitian	123
Lampiran 6 Sertifikat Kelaikan Etik.....	124
Lampiran 7 Protokol Isolasi CD34 Stem Cell Tech	125
Lampiran 8 Protokol Isolasi T Cell Stem Cell Tech	126
Lampiran 9 <i>Letter of Acceptance</i> Interciencia (Scopus Q2).....	127
Lampiran 10 Jurnal <i>Accepted</i> Interciencia (Scopus Q2).....	129
Lampiran 11 Interaksi Kontrol dan Perlakuan.....	142
Lampiran 12 Uji Statistik Homogenitas.....	171
Lampiran 13 Uji Statistik Analisis.....	178
Lampiran 14 Analisa Jalur Perlakuan Penelitian.....	206
Lampiran 15 Daftar Riwayat Hidup.....	209