

OPTIMASI ISOLASI SEL PUNCA DARI JARINGAN LEMAK MANUSIA DAN IMMUNOPHENOTYPING

by Ago Harlim

Submission date: 17-Jul-2018 09:42AM (UTC+0700)

Submission ID: 983043563

File name: OPTIMASI_ISOLASI_SEL_PUNCA_DARI_JARINGAN_LEMAK_MANUSIA_DAN.pdf (382.19K)

Word count: 2354

Character count: 14351

OPTIMASI ISOLASI SEL PUNCA DARI JARINGAN LEMAK MANUSIA DAN IMMUNOPHENOTYPING

Rilianawati Abbas, Elrade Rofaani, Ago Harlim

13
Pusat Teknologi Farmasi dan Medika-Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

Alamat Email: rilianawati@bppt.go.id

Abstract

2
In the past few decades, attention and research in the field of stem cell are progressing very rapidly. Hospitals in Indonesia have been using stem cells as an alternative to cure some illnesses like diabetes, heart disease, fractures and joints, dental implants, and asthma. Currently, adult stem cells can be obtained not only from the spinal cord and peripheral vessels, but also from fat tissues of the human body, where it can be isolated as adult stem cells (mesenchymal stem cells). Human adipose tissue is a great source of mesenchymal stem cells. Adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) are easily isolated, can differentiate into multi-lineage cells and have various clinical application. Consideration of fat tissue as the source of mesenchymal stem cells (MSCs) for autologous tissue engineering is because they are readily available in abundant quantities through minimal invasive procedures, as well as easily cultured and propagated. Besides, the fat tissue is a type of adult stem cells (ASCs) that capable of metamorphosis / transdifferentiation into various strains due to the nature of high plasticity. Therefore it is possible to proliferate and differentiate into the desired direction of the network. Therefore, the aim of this study is to support the government in providing a stem cell production technology that can be used for alternative treatment for diseases that are difficult to cure with chemical treatments such as cancer and diabetes.

Keywords: mesenchymal stem cell, adipose tissue, technology

1. PENDAHULUAN

Dalam beberapa decade terakhir, penelitian dalam bidang stem cell berkembang sangat pesat. Rumah sakit-rumah sakit di Indonesia telah menggunakan stem cell sebagai alternative untuk penyembuhan beberapa penyakit seperti diabetes, penyakit yang berhubungan dengan hati, patah tulang dan persendian, implant gigi dan asma. Saat ini, sumber sel punca dewasa tidak hanya berasal dari sumsum tulang belakang dan pembuluh peripheral, tetapi juga berasal dari jaringan lemak sebagai sumber mesenkimal stem cell sebagai rekayasa jaringan autologous, dan juga mudah untuk dikultur dan diperbanyak. Selain itu, sel punca dewasa jaringan lemak merupakan jenis dari yang memungkinkan metamorphosis/transdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel dengan fleksibilitas yang tinggi, sehingga memungkinkan berproliferasi dan berdiferensiasi dalam jalur yang dikehendaki.

Saat ini, perkembangan dalam bidang terapi sel telah memberikan pendekatan baru dalam memperbaiki dan meregenerasi jaringan. Sel punca mesenkimal atau *mesenchymal stem cells* (MSC) merupakan sel punca multipoten yang mampu memperbaharui dirinya sendiri dan memiliki potensi diferensiasi menjadi adiposit, kondrosit dan osteoblas yang memiliki peran penting dalam terapi regeneratif (Zuk *et al.*, 2001). Oleh karena kemampuan memperbaharui diri, MSC merupakan sumber sel yang ideal dalam rekayasa jaringan/tulang (Patel *et al.*, 2013).

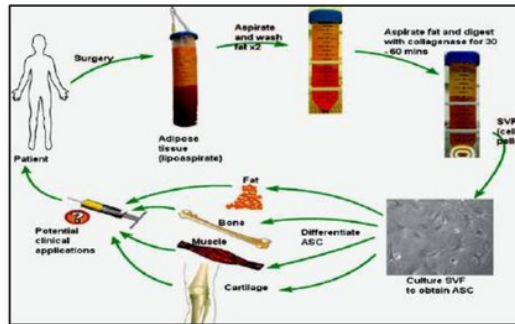
MSC dapat diperoleh dari berbagai sumber pada manusia dewasa, yang umumnya menggunakan sumsum tulang belakang. Namun, pengambilan MSC melalui sumsum tulang belakang memiliki beberapa kekurangan, yaitu seperti jumlah MSC yang didapatkan relatif rendah dan prosedur pengambilannya yang relatif menyakitkan dan berisiko tinggi bagi pasien (Zuk *et al.*, 2001). Sumber lainnya yang menarik perhatian adalah jaringan adiposa, yang menawarkan kelebihan seperti jumlah MSC yang banyak dan prosedur pengambilan yang lebih mudah (Locke *et al.*, 2009). Oleh karena itu, MSC asal jaringan adiposa

dikatakan sebagai sumber MSC yang baik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendukung pemerintah dalam menyediakan suatu teknologi produksi sel punca yang dapat digunakan untuk pengobatan alternatif untuk penyakit-penyakit yang sulit untuk disembuhkan dengan pengobatan kimiawi seperti kanker dan diabetes.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Isolasi Sel Punca MSC Asal Jaringan Adiposa

Jaringan adiposa didapatkan dari donor manusia yang sehat dengan persetujuan tindakan medis di *Johnson Medical and Beauty Clinic* dengan metodologi yang digunakan telah disetujui oleh kode etik yang berlaku. Jaringan lemak adiposa diisolasi secara enzimatis dengan collagenase dengan modifikasi. Diinkubasi pada 5% CO₂, 37°C dan diamati pertumbuhan selnya. Jika sel mencapai 80% *confluency*, sel di subkultur.



Gambar 1. Prosedur Isolasi SPM dari jaringan adiposa (Sung et al., 2012). Jaringan adiposa yang dipanen dengan prosedur sedot lemak disentrifugasi, pelet yang didapat kemudian ditambahkan kolagenase tipe II dan diencerkan dengan saline. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama 30 menit pada inkubator 37°C dan disentrifugasi. Pelet yang didapat dicuci dan disentrifugasi (200 g, selama 3 menit) sebanyak 3 kali. Pelet dari hasil sentrifugasi terakhir berisi sel punca.

2.2. Kultur MSC Asal Jaringan Adiposa

Setelah proses isolasi, MSC asal jaringan adiposa ditumbuhkan dalam media tumbuh yang tersusun atas Alpha-Minimum Essential Medium (α -MEM) dengan penambahan suplementasi penicillin-streptomycin dan *platelet rich plasma* (PRP) yang diinkubasi dalam inkubator 37°C dan 5% CO₂. Media tumbuh diganti setiap 3 hari dan ditripsinasi (0.05% trypsin-EDTA; Sigma) ketika sel telah mencapai konfluensi. Sel disubkultur setiap 3-5 hari dan diperbanyak hingga mencapai *pasase* 12.

2.3. Perhitungan Cell dengan Menggunakan Haemocytometer

Dibuang media kultur dalam 25 T-flask atau 75 T-flask. Ditambahkan 1 ml PBS untuk 25 T-flask atau 3 ml PBS untuk 75 T-flask tersebut dengan lembut diguncang kemudian cairannya dibuang. Sel punca dalam T-flask ditripsinasi dengan Trypsin-EDTA. Selanjutnya, sel punca diinkubasi dalam 5% CO₂ dan inkubator 37°C selama 5 menit. Media tumbuh berfungsi sebagai solusi berhenti untuk menghentikan aktivitas tripsin.

Setelah penambahan media tumbuh, sel punca dipindahkan ke tabung baru dan disentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet disaring kembali di media kultur. Volume 10 μ l diambil dari pelet *resuspended* dan dicampur dengan 10 μ l trypan blue. Campuran dimasukkan ke haemocytometer kemudian dihitung di bawah mikroskop. Jumlah sel yang didapatkan dapat digunakan untuk kegiatan dalam penelitian ini.

2.4. Viabilitas Sel Punca

Sel punca ditumbuhkan dalam 25 T-flask dengan menggunakan media tumbuh dan serum PRP. Setelah 3 hari, sel akan tumbuh 80% *confluent* dan akan disubkultur terus menerus sampai dengan *pasase* 12.

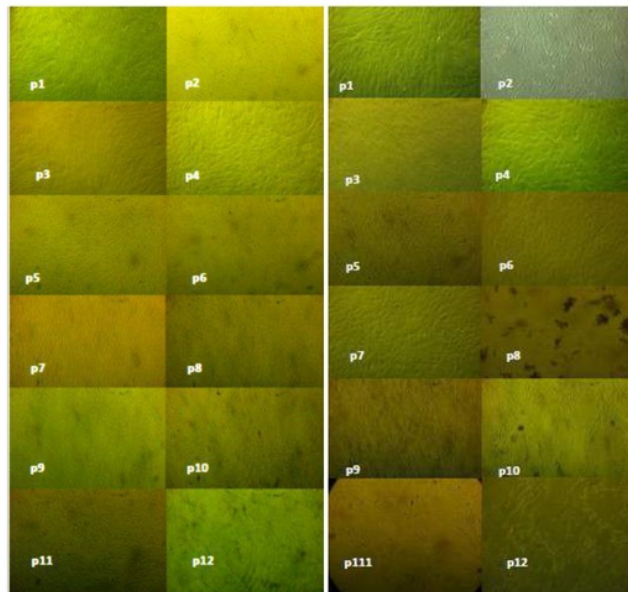
2.5. Karakterisasi hMSC dengan Flowsitometri

Sel punca mesenkim adiposa atau human *Mesenchymal Stem Cells* (hMSC) yang dipakai adalah dari pasien 1 dengan *pasase* 2 dan kepadatan 2×10^6 sel/ml. Masing-masing komponen reagen kit hMSC dipersiapkan baik hMSC *positive cocktail marker* (mengandung marker positif CD73-APC, CD90-FITC, CD105-PerCP-Cy dan CD44-PE) dan hMSC *negative marker* (mengandung CD11b atau CD14, CD19 atau CD79a, CD45, dan HLA-DR yang semuanya dilekatkan pada pewarna fluoresen PE). Sebanyak 10¹⁷ hMSC dilekatkan dengan masing-masing larutan hMSC reagent kit positif dan negatif *cocktail marker* kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan tempat gelap. Pencucian dilakukan menggunakan Phosphat Buffer Saline (PBS) dengan cara disentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit. Kemudian sampel sel punca yang telah dilekatkan dan terwarnai siap untuk dianalisa pada flowsitometer FACSCANTO BD.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Variabilitas Sel Puncak

Dari hasil viabilitas sel punca yang didapatkan terlihat bahwa pada viabilitas sampel 1 dan sampel 2 sampai dengan pertumbuhan *pasase* 1–12. Hal ini menunjukkan bahwa metoda isolasi sel punca mesenkim sudah baik dengan dilihatnya pertumbuhan sel punca yang bisa sampai *pasase* 12 yang merupakan *late pasase*.

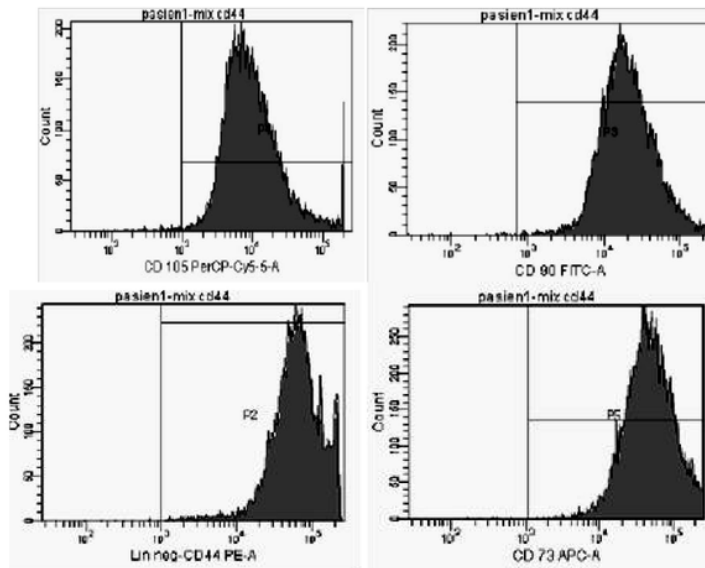


Gambar 2. Viabilitas sampel 1; perbesaran 20x, Gambar. 3. viabilitas sampel 2, perbesaran 20x

3.2. Karakterisasi Immunophenotyping Sel Punca Mesenkim

3.2.1. Sampel 1 Pasase 2

Pengujian karakterisasi sel punca mesenkim adiposa dilakukan terhadap adanya sub-populasi sel punca adiposa mesenkim yang memiliki ekspresi positif terhadap CD 73, 90, 44, dan 105. Hasil pengujian karakterisasi dengan flowsitometer FACS-CANTO BD dilakukan pada CD90-FITC; CD73-APC; CD105-PerCP-Cy dan CD44-PE (Gambar 1 dan Tabel 1).



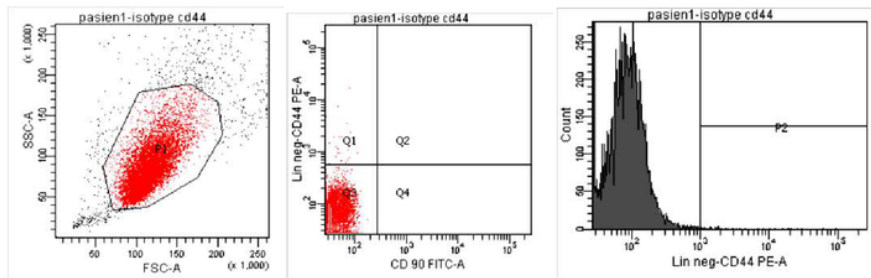
Gambar 4. Hasil pengukuran karakterisasi Sel Punca Mesenkim Adiposa pasien 1 pasase 2 dari kiri atas menuju kanan bawah : (a) sub-populasi CD90-FITC; (b) sub-populasi CD105-PerCp-Cy5,5; (c) CD73-APC; dan (d) sub-populasi CD44-PE

Pada Gambar 4 dan Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil pengukuran karakterisasi sel punca mesenkim adiposa sampel 1 pasase 2 memiliki sub-populasi CD73-APC sebesar 99.9%; CD90-FITC sebesar 99.2%; CD44-PE sebesar 99.9%; dan CD105-PerCp-Cy5,5 sebesar 99.2%. Persentase lebih besar jika dibandingkan dengan standar persentase sub-populasi yang harus diperoleh, yaitu minimal 85%. Oleh karena itu, sampel sel punca hasil isolasi ini bisa dinamakan sebagai sel punca mesenkim adiposa. Sel tersebut sangat berpotensi untuk digunakan pada proses selanjutnya, seperti diferensiasi untuk perbaikan jaringan, seperti sel kondroisit, otot, saraf, islet B dan lain-lain.

Tabel 1. Hasil karakterisasi positif subpopulasi sel punca mesenkim adiposa sampel 1 pasase 2

No	Karakterisasi permukaan imunofenotipe	Persentase sub-populasi (%)
1	Antibodi anti-human CD73 APC	99.9
2	Antibodi anti-human CD90 FITC	99.2
3	Antibodi anti-human CD44 PE	99.9
4	Antibodi anti-human CD105 PerCP-Cy5,5	99.2

Pengujian karakterisasi negatif sel punca mesenkim adiposa dilakukan terhadap adanya sub-populasi sel punca adiposa mesenkim yang memiliki ekspresi negatif terhadap CD11b atau CD14, CD19 atau CD79a, CD44, CD45, dan HLA-DR. Hasil pengujian karakterisasi dengan flowsitometer FACS-CANTO BD dilakukan pada CD90 CD11b atau CD14, CD19 atau CD79a, CD44, CD45, dan HLA-DR-PE (Gambar 5 dan Tabel 2).



Gambar 5. Hasil pengukuran karakterisasi negatif sel punca Mesenkim Adiposa sampel 1 pasase 2 dari : (a) subpopulasi sel punca; (b) sub-populasi CD90-FITC terhadap lineage negatif-PE; (c) sub-populasi lineage negatif-PE

Pada Gambar 5 dan Tabel 2 menunjukkan bahwa hasil pengukuran karakterisasi negatif sel punca mesenkim adiposa sampel 1 pasase 2 memiliki sub-populasi sel punca sebesar 92.1%; lineage negatif-PE terhadap CD90-FITC sebesar 99.5%; dan lineage negatif-PE 0.4%. Persentase subpopulasi dengan karakterisasi marker negatif hampir sebesar 0%. Oleh karena itu, sampel sel punca hasil isolasi ini bisa dinamakan sebagai sel punca mesenkim adiposa karena memiliki marker negatif yang 0%. Sel tersebut berpotensi untuk digunakan pada proses selanjutnya, seperti diferensiasi untuk perbaikan jaringan, seperti sel kondroisit, otot, saraf, islet B dan lain-lain.

Tabel 2. Hasil karakterisasi negatif subpopulasi sel punca mesenkim adiposa sampel 1 pasase 2 :

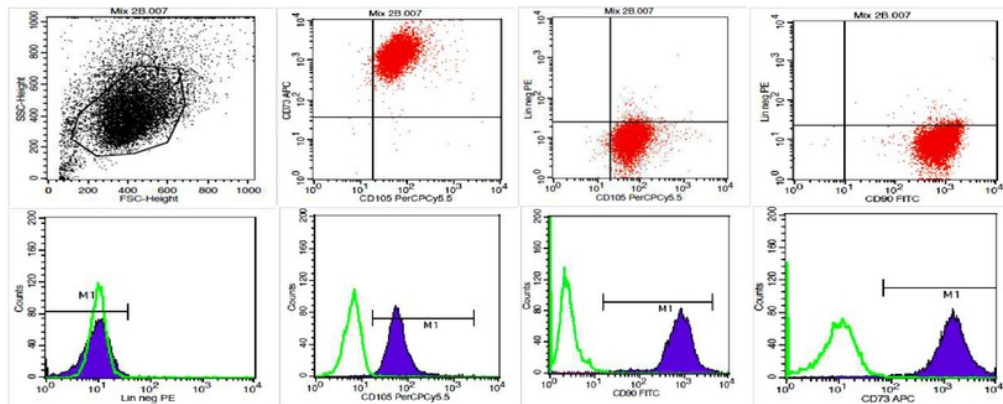
No	Karakterisasi permukaan imunofenotipe	Persentase sub-populasi (%)
1	Subpopulasi sel punca (P1)	92.1
2	Antibodi lineage negatif-PE terhadap CD90-FITC	99.5
3	Antibodi lineage negatif-PE	0.4

3.2.2. Sampel 2 pasase 2

Pengujian karakterisasi sel punca mesenkim adiposa dilakukan terhadap adanya sub-populasi sel punca adiposa mesenkim yang memiliki ekspresi positif terhadap CD 73, 90, 44, dan 105. Hasil pengujian karakterisasi dengan flowsitometer FACS-CANTO BD dilakukan pada CD90-FITC; CD73-APC; CD105-PerCP-Cy; dan CD44-PE (Gambar 6 dan Tabel 3).

No	Karakterisasi permukaan imunofenotipe	Persentase sub-populasi (%)
1	Antibodi anti-human CD73 APC	98.77
2	Antibodi anti-human CD90 FITC	99.18
3	Antibodi anti-human CD105 PerCP-Cy5,5	99.45

Gambar 6 dan Tabel 3 menunjukkan bahwa hasil pengukuran karakterisasi sel punca mesenkim adiposa pasien 2 pasase 2 memiliki sub-populasi CD73-APC sebesar 98.77% dan CD90-FITC sebesar 99.18%; dan CD105-PerCp-Cy5,5 sebesar 99.45%. Persentase sub-populasi yang diperoleh lebih besar jika dibandingkan dengan standar persentase sub-populasi, yaitu minimal 95%. Oleh karena itu, sampel sel punca hasil isolasi ini bisa dinamakan sebagai sel punca mesenkim adiposa.



Gambar 6. Hasil pengukuran karakterisasi Sel Punca Mesenkim Adiposa sampel 2 pasase 1: (a) proses gating sub-populasi sel punca pada filter side- dan forward scatter; (b) sub-populasi CD105-PerCp-Cy5,5 dan CD73-APC; (c) sub-populasi CD105-PerCp-Cy5,5 dan Lin Negatif CD44-PE; (d) sub-populasi CD90-FITC dan Lin Negatif CD44-PE; dan (e) sub-populasi Lin Negatif CD44-PE; (f) sub-populasi CD90-FITC; (g) sub-populasi CD105-PerCp-Cy5,5; (h) sub-populasi CD73-APC.

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian potensi aktifitas dari ekstrak temu ireng dan pati temulawak dalam meningkatkan sistem imun tubuh melalui pengukuran produksi hidrogen peroksida (H₂O₂) pada sel RAW 264.7 secara in vitro adalah Ekstrak pati temulawak dan ekstrak temu ireng tidak toksik terhadap sel RAW 264.7 dengan IC₅₀ sebesar 432.417 ppm untuk ekstrak pati temulawak dan 460.532 ppm untuk ekstrak temu ireng, sehingga dapat ditentukan dosis aman untuk uji produksi H₂O₂. Ekstrak pati temulawak dan ekstrak temu ireng mempunyai potensi meningkatkan sistem imun tubuh dengan mengaktifasi makrofag untuk meningkatkan sekresi H₂O₂.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Cheah YH, Azimahtol HL, Abdullah NR. 2006. Xanthorrhizol exhibits antiproliferative activity on MCF-7 breast cancer cells via apoptosis induction. *Anticancer Res.* 26(6B):4527-4534
- 8 Hossain CF, Al-Amin M, Say 12 ASM, Siragee IH, Tunan AM, Hassan F, Kabir MM, Sultana GNNS. 2015. Antinociceptive principle from *Curcuma aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15:191, DOI: 10.1186/s12906-015-0720-6
- 20 Hwang JK, Kim AJ, Sohn JH, Han KL, Lee SH, Cho, JH. 2010. Immunostimulating of Polysaccharides isolated from *Curcuma xanthorrhiza* and manufacturing method thereof. Patent Application Publication. No.: US 2010/0048885 A1.
- 1 Kim AJ, Kim YO, Shim JS, Hwang JK. 2007. Immunostimulating activity of crude polysaccharide extract isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(6):1428-1438
- 16 Kresno SB. 2001. *Imunologi (Diagnosis clan Prosedur Laboratorium)*. Edisi keempat Jakarta: Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- 4 Lee D, Park S, Bae S, Jeong D, Park M, Kang C et al. 2015. Hydrogen peroxide-activatable antioxidant prodrug as a targeted therapeutic agent for ischemiareperfusion injury. *Scientific Reports* 5:16592, DOI: 10.1038/srep16592
- 10 Mitra SK, Saxena E, Dixit MN. 2009. Natural Immunostimulant Compositions, Methods For Obtaining The Same And Pharmaceutical Formulations Thereof. Patent Application Publication N0.2 US 2009/0136602 A1.
- 3 Oon SF, Nallappan M, Tee TT, Shohaimi S, Kassim NK, Sa'ariwijaya MS, Cheah YH. 2015. Xanthorrhizol: a review of its pharmacological activities and anticancer properties. *Cancer Cell Int.* 15:100. doi: 10.1186/s12935-015-0255-4
- 1 Reanmongkol W, Subhadhirasakul S, Khaisombat N, Fuengnawakit P, Jantasila S, Khamjun A. 2006. Investigation the antinociceptive, antipyretic and anti-inflammatory activities of *Curcuma aeruginosa* Roxb. extracts in experimental animals Songklanakarinn J. *Sci. Technol.* 28(5) : 999-1008
- 9 Rosidi A, Khomsan A, Setiawan B, Riyadi H, Briawan D. 2016. Antioxidant potential of Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*). *Pakistan Journal of Nutrition* 15(6):556-560.
- 6 Wijayanti M.W., 2000, Sekresi Reactive Oxygen Intermediates oleh Makrofag Peritoneum Mencit yang Diimunisasi Selama Infeksi *Plasmodium berghei*, *BIK*, 32, 77-82

OPTIMASI ISOLASI SEL PUNCA DARI JARINGAN LEMAK MANUSIA DAN IMMUNOPHENOTYPING

ORIGINALITY REPORT

17%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

10%

PUBLICATIONS

8%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	link.springer.com Internet Source	4%
2	www.omicsonline.org Internet Source	2%
3	"Anticancer Plants: Mechanisms and Molecular Interactions", Springer Nature, 2018 Publication	1%
4	journal.frontiersin.org Internet Source	1%
5	Aaron W. James, Janette N. Zara, Xinli Zhang, Asal Askarinam et al. "Perivascular Stem Cells: A Prospectively Purified Mesenchymal Stem Cell Population for Bone Tissue Engineering", STEM CELLS Translational Medicine, 2012 Publication	1%
6	eprints.uad.ac.id Internet Source	1%
7	Renee F. Conway, Kevin M. Okarski, John A.	

Szivek. "A Purification Technique for Adipose-Derived Stromal Cell Cultures Leads to a More Regenerative Cell Population", Journal of Investigative Surgery, 2018

Publication

1%

8

www.biomedcentral.com

Internet Source

1%

9

Submitted to Mae Fah Luang University

Student Paper

1%

10

www.faqs.org

Internet Source

1%

11

Keum Sil Lee, Hye Won Kang, Hoon Taek Lee, Hye-Jin Kim, Chan-Lan Kim, Jae-Young Song, Kyung Woo Lee, Sang-Ho Cha. "Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells", Research in Veterinary Science, 2014

Publication

1%

12

Hossain, Chowdhury Faiz, Mohammad Al-Amin, Abu Sadat Md. Sayem, Ismail Hossain Siragee, Asif Mahmud Tunan, Fahima Hassan, Md. Mohiuddin Kabir, and Gazi Nurun Nahar Sultana. "Antinociceptive principle from *Curcuma aeruginosa*", BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015.

Publication

<1%

13

uad.portalgaruda.org

Internet Source

<1%

14

www.neliti.com

Internet Source

<1%

15

www.cmemaz.com

Internet Source

<1%

16

scholar.unand.ac.id

Internet Source

<1%

17

majour.maranatha.edu

Internet Source

<1%

18

Mahetab H. Amer, Felicity R.A.J. Rose, Lisa J. White, Kevin M. Shakesheff. "A Detailed Assessment of Varying Ejection Rate on Delivery Efficiency of Mesenchymal Stem Cells Using Narrow-Bore Needles", STEM CELLS Translational Medicine, 2016

Publication

<1%

19

"14th Annual Meeting on Surgical Research 14. Chirurgische Forschungstage : 23.–25. September 2010, Rostock, Germany", Langenbeck s Archives of Surgery, 07/13/2010

Publication

<1%

20

T. K. Lim. "Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants", Springer Nature, 2016

Publication

<1%

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

OPTIMASI ISOLASI SEL PUNCA DARI JARINGAN LEMAK MANUSIA DAN IMMUNOPHENOTYPING

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/0

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6
