

ISOLASI SEL PUNCA MESENKIM DARI KULTUR FIBROBLAS KULIT MANUSIA MENGUNAKAN SISTEM PEMURNIAN BERBASIS MAGNET

¹Indra Kusuma, ²Siska A. Kusumastuti, ³Restu Syamsul Hadi, ⁴Churiyah, ⁵Yurika Sandra,
⁶Faiza Kara Fabiola, ⁷Agung Eru Wibowo, ⁸Rilianawati

^{1,3,5}Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jl Letjen Supraptor Cempaka Putih Jakarta Pusat 10510

^{2,4,6,7,8}Pusat Teknologi Farmasi dan Biomedika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Kompleks
Puspitek Serpong Banten

e-mail korespondensi: indra.kusuma@yarsi.ac.id

Abstrak. Kedokteran regeneratif dengan memanfaatkan potensi sel punca membutuhkan sumber sel yang banyak seperti fibroblas asal preputium hasil khitan. Subpopulasi sel punca mesenkim dapat di isolasi dari kultur fibroblas menggunakan penanda CD105. Penggunaan sistem isolasi berbasis magnet yaitu MACS memungkinkan isolasi subpopulasi sel yang mengekspresikan penanda khas CD105. Sebanyak 16 kelompok kultur mengalami pemurnian sel CD105 dengan sistem MACS menghasilkan proporsi fraksi positif yang bervariasi bergantung pada pasasi, konfluensi, dan medium yang digunakan. Penggunaan conditioned medium meningkatkan persentase fraksi CD105 pada proses pemurnian ($p < 0.05$). Meski demikian kultur perbanyak sel punca mesenkim secara adherent maupun suspensi dengan teknik hanging drop tidak dapat menggunakan medium standar yang digunakan sebelumnya karena menyebabkan diferensiasi spontan dan penurunan jumlah sel dengan CD105+ pada kultur. Fraksi sel CD105 negatif masih dapat menghasilkan sel punca mesenkim dengan kultur standar meski dalam proporsi yang rendah. Optimasi medium dan sistem kultur diperlukan untuk kultur perbanyak sel punca yang diisolasi dari fibroblas kulit manusia.

Kata Kunci: sel punca mesenkim, CD105, MACS

1. Pendahuluan

Perkembangan teknologi kedokteran saat ini mengarah pada pendekatan regeneratif yang dikenal sebagai kedokteran regeneratif. Pendekatan regeneratif memanfaatkan potensi yang dimiliki sel punca berupa kemampuan diferensiasi sehingga diharapkan dapat menggantikan jaringan dan organ yang luka, rusak, atau kehilangan fungsinya. Sumber sel punca yang pertama kali diperoleh dari jaringan embrionik dan sumsum tulang (Hine 2009; Efendi 2009). Sel punca kemudian juga ditemukan pada jaringan dewasa lain seperti darah tepi, tali umbilikus, jaringan lemak, jantung, otak, dan kulit.

Sel punca dibagi berdasarkan potensi diferensiasinya menjadi tiga jenis, yaitu (1) unipoten, hanya dapat berdiferensiasi menjadi satu tipe jaringan embrional; (2) multipoten, dapat berdiferensiasi menjadi dua tipe jaringan embrional; dan (3) pluripoten yang dapat berdiferensiasi menjadi tiga lapisan embrional atau triploblastik. Sel punca pluripoten terdiri atas 3 jenis, yaitu sel punca embrional, *induced-pluripoten stem cells* (iPSC), dan jenis yang terbaru yaitu sel muse (*multilineage differentiating stress enduring*). Sel muse terutama diperoleh dari sel-sel mesenkimal, yaitu diantaranya sel fibroblas (Simerman dkk., 2014).

Indonesia sebagai negara dengan jumlah penduduk muslim terbesar di dunia memiliki potensi produksi sel punca yang saat ini masih dianggap sebagai sampah medis, yaitu preputium. Khitan secara rutin dilaksanakan sepanjang tahun terutama pada musim liburan sekolah. Rumah Sunatan salah satu klinik yang fokus pada khitan menerima lebih dari 15 ribu pasien per tahun (korespondensi pribadi). Isolasi sel dari preputium rutin dikerjakan untuk mendapatkan fibroblas dan keratinosit primer untuk tujuan penelitian (Kusuma & Hadi 2013; Hadi dkk., 2014).

Sel muse yang diperoleh dari sel fibroblas diketahui memiliki penanda khas CD105 dan SSEA3. CD105 adalah penanda khas untuk sel punca mesenkim sementara SSEA3 adalah penanda khas untuk sel punca pluripoten. Sel muse tidak membentuk teratoma meski demikian, tetap dapat berdiferensiasi menjadi sel dari ketiga lapisan embrional (Kuroda dkk., 2013). Pada penelitian ini isolasi sel punca dilakukan menggunakan sel fibroblas dalam biorepositori yang sebelumnya diisolasi dari preputium anak usia SD. Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi sel punca dengan penanda khas CD105 dari kultur sel fibroblas manusia menggunakan sistem pemurnian berbasis magnet atau MACS.

2. Metode Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium kultur sel Universitas YARSI selama bulan Agustus-September 2015. Sebanyak 16 kelompok kultur sel fibroblas dari berbagai pasasi (P1-9) digunakan untuk pemurnian CD105 menggunakan sistem MACS. Sel fibroblas diperoleh dari *biorepository* Universitas YARSI. Eksperimen dilakukan menggunakan sel yang telah di kultur dalam inkubator (37°C, 5% CO₂) selama minimal 1 minggu menggunakan medium DMEM (Gibco) dengan suplementasi FBS 10% (Gibco) dan 1% larutan antibiotik-antimikotik dalam T-*flask* 25 (TPP).

Pemurnian menggunakan sistem MACS dengan penanda khas CD105 (Miltenyi) dilakukan dengan inkubasi sel fibroblas yang telah di panen dengan antibody CD105 yang terkonjugasi pada butiran besi-mikro (*microbeads*) selama 30 menit pada suhu 4 C sesuai petunjuk dari produsen (Miltenyi). Fibroblas yang telah terkonjugasi dengan antibody CD105 kemudian dilewatkan pada kolom tipe MS pada magnet MACS separator. Sel yang terikat pada antibody yang terkonjugasi dengan butiran besi-mikro akan tertahan dalam medan magnet dalam kolom MS sementara sel yang CD105 negatif akan terpisah membentuk fraksi negatif. Fraksi CD105 positif kemudian dilepaskan dari medan magnet dan dilusi dengan bufer PBS (Gibco) untuk mendapatkan fraksi positif.

Jumlah sel dari masing-masing fraksi kemudian dihitung menggunakan hemositometer dengan teknik *tryphan-blue exclusion test*. Persentase sel fraksi positif kemudian dibandingkan berdasarkan tingkat pasasi sel, *doubling time* dan pemurnian serial. Terakhir sel fraksi positif kemudian ditanam dengan teknik *hanging drop* dengan densitas tanam sebanyak 1 sel/drop medium untuk menginduksi terbentuknya *cell cluster* yang menyerupai *embryoid body*. Teknik kultur *hanging drop* diketahui dapat menginduksi diferensiasi spontan pada sel punca.

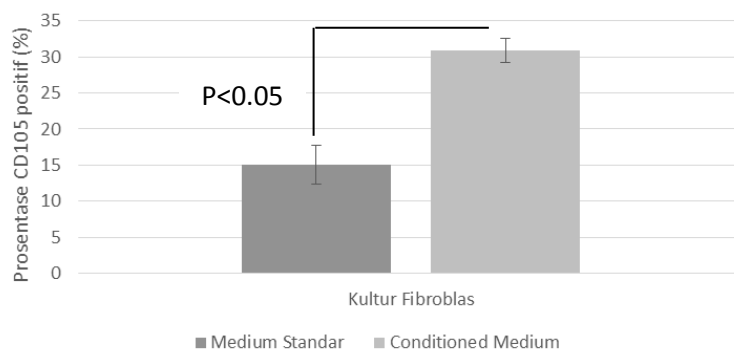
3. Hasil Penelitian

Sebanyak 16 kali sesi pemurnian dilakukan pada 16 kultur sel fibroblas dengan hasil pada Tabel. Pada tabel tampak bahwa kultur fibroblas memiliki subpopulasi sel punca mesenkim (*mesenchymal stem cell/ MSC*) yang mengekspresikan penanda CD105. Fraksi negatif yang diperoleh dari hasil pemurnian dengan sistem MACS setelah dikultur kembali memiliki subpopulasi yang mengekspresikan CD105 meski dalam jumlah kurang dari 4%.

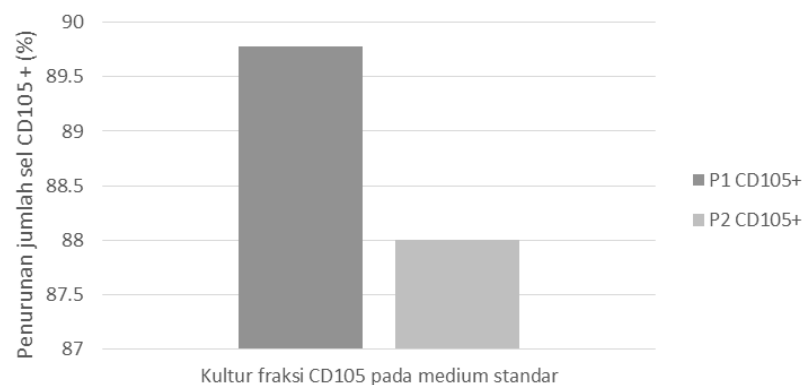
Kultur menggunakan *conditioned medium* menghasilkan persentase fraksi positif yang tinggi ($p < 0,05$; Gambar 1) dengan peningkatan perolehan fraksi positif hingga dua kali lipat. Meski penggunaan *conditioned medium* menyebabkan peningkatan *doubling time* dan penurunan jumlah sel yang dipanen. Pemurnian secara serial dilakukan dengan menanam ulang fraksi positif yang diperoleh dalam medium standar sebanyak dua kali lalu dimurnikan kembali. Pada Gambar 2 tampak bahwa penggunaan medium standar menyebabkan penurunan persentase subpopulasi CD105 sekitar 85%.

Tabel Deskripsi Hasil Proses Pemurnian Kultur Fibroblas Menggunakan Penanda Khas CD105

| No | Jumlah sel | Fraksi positif (%) | Doubling Time | Pasasi | Keterangan |
|----|------------|--------------------|---------------|--------|----------------------|
| 1 | 2.56E+06 | 7.4 | - | P7 | |
| 2 | 2.64E+06 | 13.5 | 40 | P1 | |
| 3 | 2.64E+06 | 18.2 | 40 | P1 | |
| 4 | 5.85E+05 | 32.1 | 106 | P1 | Conditioned Medium |
| 5 | 5.85E+05 | 29.7 | 106 | P1 | Conditioned Medium |
| 6 | 1.10E+06 | 14.8 | 71 | P9 | |
| 7 | 1.10E+06 | 12.4 | 71 | P9 | |
| 8 | 1.49E+06 | 11.8 | 57 | P8 | serial sorting |
| 9 | 1.49E+06 | 8.6 | 57 | P8 | serial sorting |
| 10 | 2.56E+06 | 12.0 | 46 | P9 | serial sorting |
| 11 | 2.00E+06 | 13.5 | - | P1 | |
| 12 | 3.78E+06 | 6.6 | 74 | P4 | |
| 13 | 1.26E+06 | 10.3 | 126 | P4 | Kultur pada MEM alfa |
| 14 | 2.41E+06 | 1.9 | - | P8 | fraksi negatif |
| 15 | 2.41E+06 | 2.3 | - | P8 | fraksi negatif |
| 16 | 1.30E+07 | 3.7 | - | P8 | fraksi negatif |

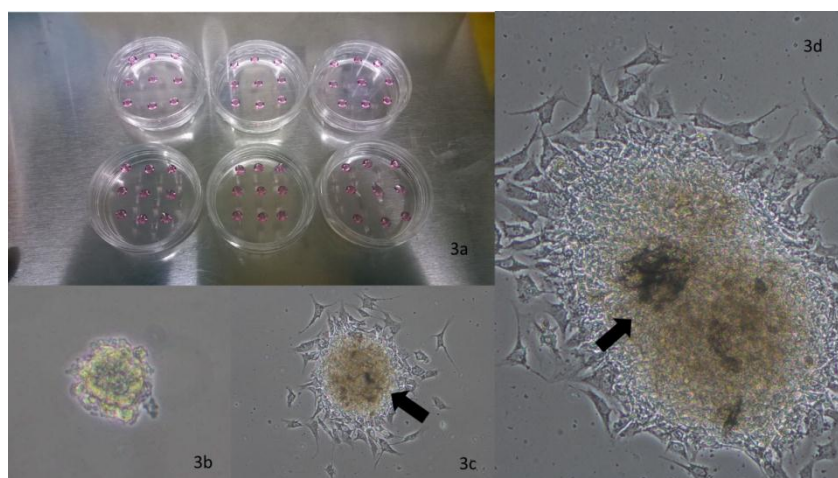


Gambar 1 Pengaruh penggunaan *conditioned medium* pada kultur fibroblas (n=5)



Gambar 2 Kultur subpopulasi CD105+ dengan sistem kultur standar (*adherent*, DMEM+ FBS 10%’ n=3)

Hasil ini mendorong upaya untuk kultur fraksi CD105 dengan metode hanging drop (Gambar 3a) dengan densitas tanam 1 sel/drops. Sebanyak 60 sel ditanam dengan medium standar dan didapati 10 dari 54 drop berisi satu sel dan dari 10 drop tersebut terdapat 2 kluster sel (Gambar 3b, 3c, dan 3d) yang menyerupai *embryoid body* setelah 3 hari kultur dalam medium standar. Kedua kluster sel setelah 12 hari kultur kemudian ditanam pada T-**flask** 25 dengan medium diferensiasi adipogenik (Stempro), namun pada hari kedua kultur mengalami kematian sel diperkirakan akibat hipoksia sentral (Gambar 3c dan 3d).



Gambar 3. Kultur hanging drops selama 12 hari menghasilkan kluster sel (tanda panah menunjukkan hipoksia sentral; Nikon 10x)

4. Pembahasan

Hasil ini sesuai dengan yang ditemukan oleh Wakao dkk. (2011), yaitu persentase sel punca dalam kultur fibroblas sangat bervariasi bergantung pada tingkat pasasi, konfluensi, dan sistem kultur termasuk medium dan suplementasi yang digunakan. Meski demikian Wakao dkk. mendapati bahwa kultur fibroblas dengan CD105+ memiliki proporsi hingga 96% jauh lebih tinggi dari hasil penelitian ini.

Fibroblas yang digunakan oleh Wakao dkk. berasal dari sumber komersial yaitu Lonza dan ScienCell.

Fibroblas dari sumber komersial umumnya diperoleh dari kulit preputium neonatus ini berbeda dengan sumber sel pada penelitian ini yang berasal dari anak usia SD. Medium yang digunakan pada penelitian ini adalah DMEM *low glucose* berbeda dengan Wakao dkk. yang menggunakan MEM alfa. Percobaan menggunakan MEM alfa pada penelitian ini menghasilkan kultur fibroblas dengan *doubling time* yang tinggi (126 jam), namun dengan fraksi CD105 yang tidak tinggi (10,3%). Perbedaan lain adalah Wakao menggunakan *flowcytometry* untuk analisis ekspresi penanda khas CD105, sementara penelitian ini menggunakan penghitungan secara manual dengan hemositometer.

Meski demikian, fraksi CD105 mampu membentuk kluster sel pada kultur suspensi dengan teknik *hanging drop*, seperti yang ditemukan oleh Kuroda (2013). Penggunaan medium standar dalam kultur *hanging drops* diperkirakan menjadi penyebab gagalnya proses diferensiasi ke arah adipogenik. Tanda hipoksia sentral pada kluster sel menunjukkan ukuran kluster yang terlalu besar sehingga sel yang di dalam mengalami kematian.

Penurunan ekspresi CD105 pada kultur fraksi CD105 diperkirakan terjadi akibat diferensiasi spontan akibat penggunaan medium standar yang mengandung serum (FBS). Di sisi lain, fraksi negatif yang ditanam ulang dengan medium yang sama menunjukkan munculnya subpopulasi sel punca mesenkim dengan proporsi yang rendah. Hal ini menunjukkan kemampuan regenerasi sel punca yang tinggi dalam membentuk klon. Tabel menunjukkan bahwa sel yang ditanam dengan *conditioned medium* mengalami peningkatan angka *doubling time*, artinya dibutuhkan waktu lebih lama untuk proliferasi sementara pada saat yang sama memiliki fraksi CD105 yang jauh lebih tinggi dari kelompok lain.

Pengamatan ini menunjukkan tingginya pengaruh sekreta sel khususnya sekreta sel punca terhadap pertumbuhan sel punca dan pencegahan diferensiasi spontan dengan metode autokrin. Sekreta yang dikeluarkan sel punca bekerja pada reseptor di sel permukaan sel itu sendiri untuk mengatur tingkat proliferasi dan diferensiasi sel. Hasil ini sesuai dengan yang ditemukan Efendi (2009) pada sel punca asal sumsum tulang. Penggunaan *conditioned medium* sel punca mesenkim pada kultur hepatosit juga terbukti mengurangi apoptosis akibat induksi dengan karbontetraklorida (Xagorari, 2013).

Penelitian selanjutnya akan diarahkan untuk mendapatkan subpopulasi SSEA3 pada kultur fibroblas, mendapatkan sistem kultur dan medium perbanyak yang sesuai serta upaya karakterisasi sel punca menggunakan *flowcytometri*.

5. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kultur fibroblas asal preputium memiliki subpopulasi sel punca mesenkim. Subpopulasi sel punca mesenkim dapat diisolasi dan dimurnikan menggunakan sistem MACS dengan penanda khas CD105. Kultur standar menggunakan DMEM dan FBS tidak dapat digunakan untuk perbanyak sel punca mesenkim hasil isolasi dari kultur fibroblas.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih pada dr. Rika Yuliwulandari, PhD, direktur laboratorium terpadu Universitas YARSI sekaligus kepala Lembaga Penelitian Univeristas, yang memungkinkan terlaksananya penelitian ini serta dukungan dalam terbentuknya penelitian kolaborasi dengan BPPT.

Daftar Pustaka

- Efendi A. Pengaruh Conditioned Medium Rat Embryonic Fibroblas (Cm-Ref) Dengan Dan Tanpa Leukemia Inhibitory Factor (Lif) Dalam Medium Terhadap Tingkat Proliferasi Dan Sifat Pluripotensi Mesenchymal Stem Cell Sumsum Tulang Tikus Dalam Kultur In Vitro; 2009.
- Hadi RS, Kusuma I, Sandra Y. Allogeneic human dermal fibroblas are viable in peripheral blood mononuclear co-culture. *Universa Medicina*. 2014; 33(2); 34–42.
- Hine TM. Pengembangan Metode Kultur Embryonic Stem Cells dari Embrio Hasil Fertilisasi dan Produksinya dari Embrio Partenogenetik Mencit; 2009.
- Kuroda Y. et al. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nature protocols*. 2013; 8(7); 1391–415.
- Kusuma I, Hadi RS. Geraniin supplementation increases human keratinocyte proliferation in serum-free culture. *Universa Medicina*. 2013; 32(1); 3–10.
- Simerman AA. et al. A mystery unraveled: nontumorigenic pluripoten stem cells in human adult tissues. *Expert opinion on biological therapy*. 2014; 14(7); 917–29
- Wakao S. et al. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripoten stem cells in human fibroblasse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(24); 9875–80.
- Xagorari A. et al. Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013; 6(5); 831.