Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya
https://journal.unesa.ac.id/index.php/risetbiologi

Perbandingan Morfologi *Adipose-Derived Stem Cells* asal Donor Diabetes Melitus Tipe 2 dalam Medium Mengandung *Platelet-Rich Plasma* dan *Fetal Bovine Serum*

Morphology Comparison of Adipose-Derived Stem Cells from Type 2 Diabetes Mellitus Donor on Media Contained Platelet-Rich Plasma and Fetal Bovine Serum

Karina[1,2,3*], Imam Rosadi[1], Siti Sobariah[1], Iis Rosliana[1], Komang A. Wahyuningsih[1,2,4], Tias Widyastuti[1], Irsyah Afini[1]

[1]Hayandra Lab, Yayasan Hayandra Peduli, Jakarta, Indonesia, [2]Klinik Hayandra, Yayasan Hayandra Peduli, Jakarta, Indonesia, [3]Biomedik, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia, [4]Histologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta, Indonesia

History Article

Received : 26 Juli 2019
Approved: 26 Agustus 2019
Published: 30 September 2019

Key words:
ADSCs, diabetes, morphology, senescent, PRP

Kata kunci
ADSCs, diabetes, morfologi, penuaan, PRP

Abstrak

Salah satu terapi luka pada diabetes melitus tipe 2 adalah terapi sel punca. Lingkungan mikro bagi sel termasuk sel punca, dapat rusak akibat komplikasi dari diabetes. Lingkungan mikro yang rusak tersebut dapat menyebabkan penuaan (*senescent*) dini pada sel punca. Studi ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh morfologi *adipose-derived stem cells* (ADSCs) dari donor diabetes mellitus tipe 2 dalam medium yang mengandung *platelet-rich plasma* (PRP). Tahapan studi yang dilakukan yaitu menghitung variasi densitas awal ADSCs. Densitas awal untuk kultur ADSCs adalah 5,000; 10,000; dan 20,000 sel pada setiap kelompok. Hasilnya menunjukkan bahwa morfologi ADSCs dalam medium PRP umumnya lebih kecil dibandingkan morfologi ADSCs dalam medium FBS pada berbagai jumlah densitas awal ADSCs yang dikultur. Morfologi ADSCs kelompok PRP didapatkan semakin kecil luas morfologinya pada densitas kultur awal sel yang besar (20,000 = 0,014 mm^2; 10,000 = 0,016 mm^2; 5,000 = 0,018 mm^2) begitu juga kelompok FBS (20,000 = 0,032 mm^2; 10,000 = 0,032 mm^2; 5,000 = 0,036 mm^2). Luas ukuran ADSCs yang dikultur menggunakan FBS jauh lebih besar dibandingkan PRP dan berbeda bermakna pada densitas jumlah sel awal yang dikultur sebanyak 20,000 sel (p <0,05). Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa morfologi ADSCs yang dikultur dengan kerapatan densitas 20,000 sel dalam medium PRP memiliki ukuran sel yang lebih kecil secara signifikan dibandingkan medium FBS.

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) wound can be repaired by using stem cells therapy, but the complications of diabetes can damage the stem cells microenvironment. The damage can cause premature aging of stem cells. The study aimed to determine the effect of adipose-derived stem cells (ADSCs) morphology isolated from T2DM and supplemented with platelet-rich plasma (PRP) medium. In this study, the variation of initial ADSCs density was conducted. The initial density of ADSCs was 5,000; 10,000; and 20,000 cells in each group. The morphology ADSCs in the PRP medium was smaller than the ADSCs in the FBS medium at various quantities of the initial density of ADSCs. The density of cell culture has correlation with the cell size where the higher density the smaller ADSCs size in PRP (20,000 = 0.014 mm^2; 10,000 = 0.016 mm^2; 5,000 = 0.018 mm^2) and FBS group (20,000 = 0.032 mm^2; 10,000 = 0.032 mm^2; 5,000 = 0.036 mm^2). The size of ADSCs morphology supplemented by FBS was higher than PRP and significantly different in the group with density culture of cells was 20,000 (p <0.05). Based on these results showed that ADSCs morphology with seeding density 20,000 cells which cultured on media contained PRP has significantly smaller in size than on media contained FBS.

How to cite: Karina., Rosadi, I., Sobariah, S., Roslina, L., Wahyuningsih, K.A., Widyastuti, T & Afini, I. (2019). Perbandingan Morfologi Adipose-Derived Stem Cells asal Donor Diabetes Melitus Tipe 2 dalam Medium Mengandung Platelet-Rich Plasma dan Fetal Bovine Serum. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya*. 1 (2): 64-70.

*Correspondence Author: karina@hayandra.com
Jl. Kramat 6 No. 11, Jakarta Pusat
Email: karina@hayandra.com

e-ISSN 2655-9927

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus tipe 2 merupakan penyakit yang dapat menimbulkan beragam komplikasi sehingga menciptakan lingkungan mikro yang tidak baik bagi pertumbuhan sel (Burton & Faragher, 2018; Palmer *et al*., 2015). Kondisi lingkungan mikro tersebut menginduksi sel-sel untuk mengalami penuaan di jaringan sekitar. Percepatan penuaan sel pada penderita diabetes disebabkan oleh tingginya kadar gula dalam darah dan kadar *low-density lipoproteins* (LDL) yang teroksidasi (Burton & Faragher, 2018). Jenis sel yang mengalami penuaan akibat komplikasi diabetes sangat beragam termasuk sel induk/punca (Palmer *et al*., 2015).

Sel punca merupakan sel yang dapat memperbaharui diri sendiri dan berdiferensiasi menjadi jenis sel lain (Nicoletti *et al*., 2015). Sel punca pertama kali ditemukan pada abad ke-19 yang dikelompokkan menjadi dua berdasarkan sumbernya, yaitu bersumber dari embrio (*embryonic stem cells*) dan jaringan dewasa (*adult stem cells*) (Zuk, 2010). Sel punca asal jaringan dewasa yang banyak dikembangkan diantaranya sel punca asal sumsum tulang (*bone marrow stem cells/* BMSCs) dan sel punca asal jaringan lemak (*adipose derived stem cells/*ADSCs) (Zuk *et al*., 2002; Xie *et al*., 2012). Pada studi yang dilaporkan oleh Guo *et al*., (2018) menunjukkan bahwa ADSCs berpotensi sebagai terapi untuk memulihkan luka pada pasien penderita diabetes lebih baik dibandingkan BMSCs. Akan tetapi, efek mayor akibat komplikasi diabetes dapat merusak sel punca sehingga berpotensi menurunkan efektivitas sel punca (Palmer *et al*., 2015) jika digunakan sebagai terapi dalam pemulihan luka pasien diabetes. Pada umumnya, ADSCs diperbanyak dalam medium pertumbuhan mengandung 10% *fetal bovine serum* (FBS). Namun, perbanyakan sel dengan medium FBS dapat meningkatkan risiko kontaminan dan dapat menimbulkan reaksi penolakan tubuh (Kandoi *et al*., 2018). *Platelet-rich plasma* (PRP) merupakan plasma yang kaya akan trombosit dan dilaporkan mampu meningkatkan pertumbuhan ADSCs (Shen *et al*., 2015).

Kadar platelet dalam PRP adalah 20 kali lipat lebih banyak dibandingkan dalam darah (Araki *et al*., 2012) dan mengandung lebih dari 1.100 protein (Pavlovic *et al*., 2016). Sel yang disuplementasi PRP pada konsentrasi tertentu dapat meningkatkan laju proliferasi (Blande *et al*., 2009; Kacaoemer *et al*., 2007). Hal tersebut diduga karena banyaknya molekul bioaktif pada PRP yang umumnya didominasi oleh protein *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor β* (TGF-β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor* (IGF) dan *fibroblast growth factor* (FGF) (Pavlovic *et al*., 2016; Burnouf *et al*., 2016). Protein FGF merupakan salah satu protein yang berperan penting dalam pertumbuhan sel termasuk sel punca (Atashi *et al*., 2014). Oleh karena itu, perlu dilakukan studi untuk perbaikan kualitas ADSCs dari pasien diabetes melitus tipe 2 dalam medium mengandung PRP dibandingkan dengan FBS untuk meningkatkan efektivitas ADSCs.

Pada studi ini, sampel jaringan lemak sebagai sumber ADSCs berasal dari limbah operasi sedot lemak manusia penderita diabetes melitus tipe 2. Perbaikan kualitas ADSCs donor diabetes melitus tipe 2 dilakukan dengan subtitusi nutrisi media pertumbuhan yang umumnya menggunakan nutrisi standar FBS menjadi PRP asal manusia. Uji efektivitas PRP sebagai nutrisi pertumbuhan ADSCs juga dilakukan berdasarkan variasi densitas sel awal yang dikultur untuk mengetahui konsistensi PRP dalam meremajakan dan memperbaiki kualitas morfologi ADSCs.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan Kultur ADSCs

Adipose-derived stem cells (ADSCs) diisolasi dari jaringan lemak manusia yang berasal dari satu donor penderita diabetes melitus tipe 2. Isolasi ADSCs secara enzimatis mengacu pada protokol H-Remedy dari Yayasan Hayandra Peduli (Nomor Paten: IDP000055609). Sampel jaringan lemak diberikan enzim H-Remedy sebanyak 10% kemudian diinkubasi pada kondisi suhu 37°C, 300 rpm, selama 60 menit. Inaktivasi enzim menggunakan penambahan medium *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) rendah glukosa (1 g/L) mengandung L-glutamin (4 mM) (Gibco, USA) dan disentrifugasi pada kecepatan 600xg selama 5 menit. Pelet sel mengandung ADSCs kemudian dikultur menggunakan medium DMEM yang mengandung 1% *antibiotic-antimycotic* konsentrasi 100X (Gibco, USA) dan 10% *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco, USA) pada suhu 37°C, 5% CO_2. Proses peremajaan dilakukan hingga pasase 2 (P2) untuk mendapatkan jumlah sel yang cukup untuk pengamatan morfologi ADSCs pada P3. PRP diperoleh dari Palang Merah Indonesia (PMI), Jakarta Pusat. Penelitian ini telah lulus kaji etik dengan nomor 666/UN6.C.10/PN/2017.

Pengelompokan ADSCs

ADSCs pada P3 dikelompokkan menjadi dua berdasarkan suplementasi medium yaitu ADSCs yang dikultur dalam medium mengandung 10% FBS (Gibco, USA) dan ADSCs yang dikultur dalam medium mengandung 10% PRP. Medium basal yang digunakan adalah DMEM (Gibco, USA) dengan tambahan 1% *antibiotic-antimycotic* konsentrasi 100X (Gibco, USA). Pengelompokan berdasarkan densitas sel kultur awal pada masing-masing kelompok FBS dan PRP dibagi menjadi 3 yaitu jumlah ADSCs awal sebanyak 5,000, 10,000 dan 20,000 sel. Cawan kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah 96 *well-plate*. Pengamatan morfologi dan pertumbuhan sel dilakukan pada jam ke 32.

Pengambilan Gambar Morfologi ADSCs

Gambar ADSCs *monolayer* yang dikultur pada 96-*well plate* berbagai kelompok perlakuan diambil pada jam ke-32 menggunakan mikroskop *inverted* fasa terbalik (OPTIKA, ITALY) dengan pengamatan lensa objektif 10x. Gambar disimpan ke dalam perangkat komputer dalam bentuk file .jpg menggunakan kamera digital Optika (OPTIKA, ITALY).

Kuantifikasi Luas Morfologi ADSCs

Luas area morfologi ADSCs dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak *Image J* (National Institutes of Health, USA). Adapun tahapan kuantifikasi luas morfologi ADSCs yaitu dengan melakukan kalibrasi pengaturan skala kemudian menentukan parameter pengukuran yang akan dianalisis. Pada studi ini parameter pengukuran adalah luas area (mm^2), standar deviasi (SD). Pengukuran luas morfologi ADSCs dilakukan sebanyak 35 sel menggunakan menu "*polygon selection*". Luas morfologi ADSCs yang telah terlingkupi "*polygon*" kemudian diubah hasilnya ke dalam bentuk angka luas area dengan satuan mm^2. Data yang diperoleh disimpan dalam bentuk *excel* untuk selanjutnya diolah dan dianalisis. Kualitas ADSCs diukur berdasarkan bentuk, *spreading* dan kuantifikasi luas morfologi ADSCs.

Analisis Statistik

Data yang didapat ditampilkan dalam bentuk gambar dan grafik (dinyatakan dalam rerata ± standar deviasi (SD). Analisis statistik dimulai dengan uji normalitas dan homogenitas. Analisis perbedaan menggunakan uji statistik parametrik *analysis of variance* (ANOVA).

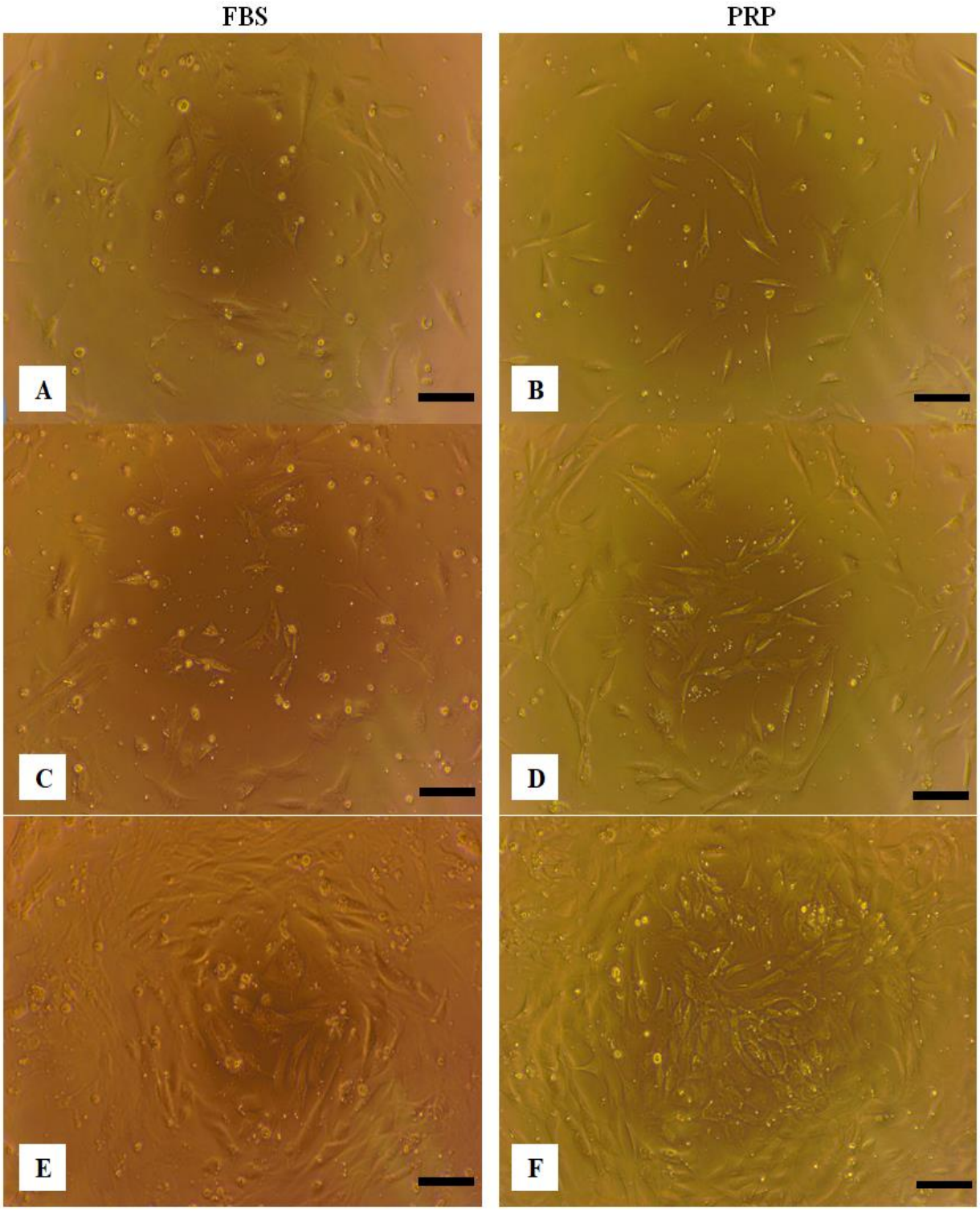
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan karakter ADSCs adalah menempel pada permukaan cawan (*well*). Morfologi ADSCs yang dikultur menggunakan FBS memiliki ukuran sel yang lebih besar dan mengalami *spreading* maksimal, sedangkan ADSCs yang dikultur menggunakan PRP umumnya membentuk seperti sel fibroblas dan memiliki ukuran yang normal (Gambar 1). Sifat sel yang menempel pada permukaan menunjukkan sel telah berinteraksi dengan substrat untuk menempel dan melakukan komunikasi selular (Horwitz & Webb, 2003).

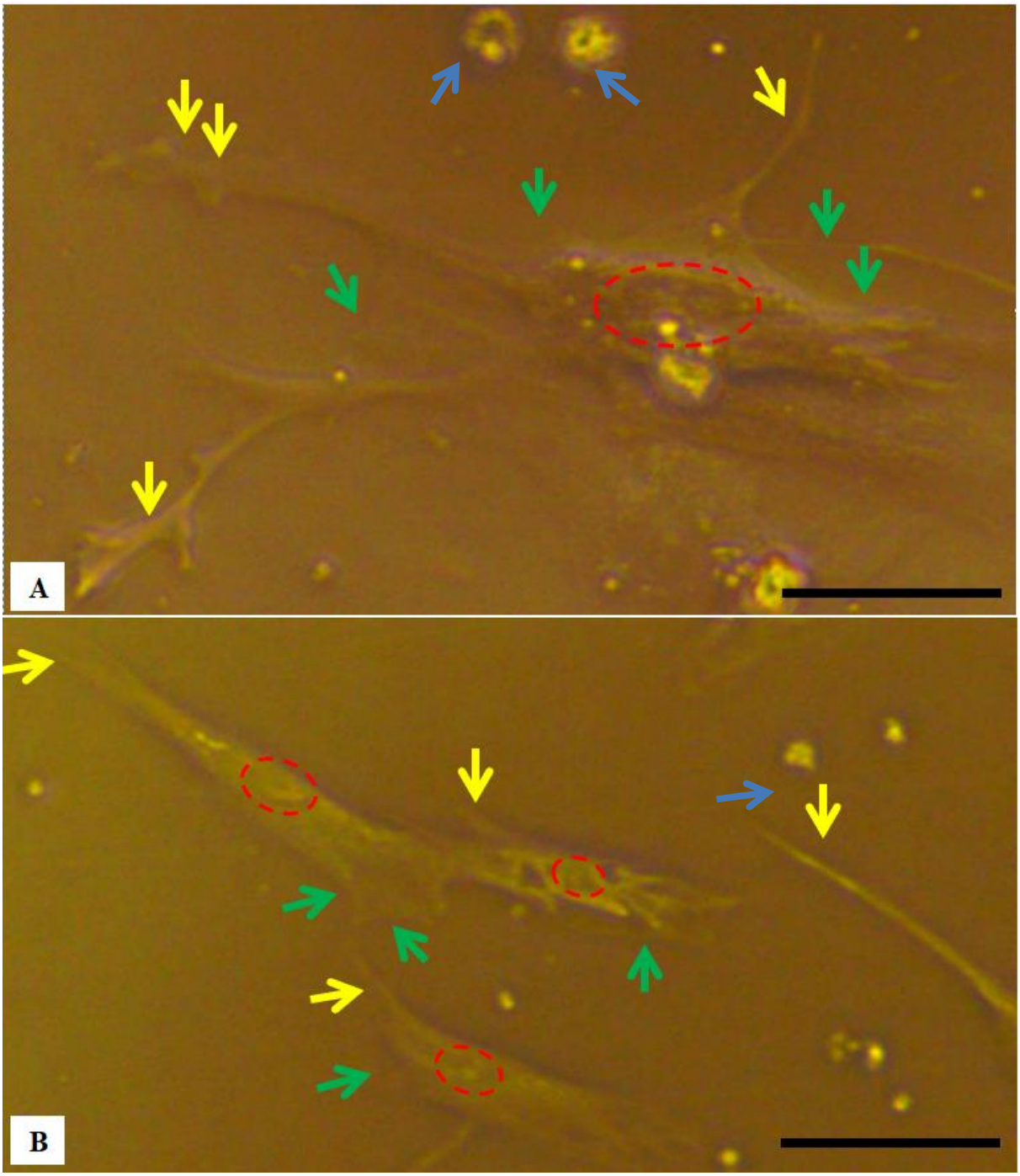
Interaksi antara sel dan substrat teramati pada setiap kelompok ADSCs yang dikultur selama 32 jam, sebaliknya interaksi sel dengan sel sedikit teramati pada ADSCs yang dikultur sebanyak 5,000 dan 10,000 sel pada kelompok FBS. Sedikitnya interaksi antar sel menyebabkan ADSCs mengalami *spreading* untuk melakukan penjuluran sitoplasma yang menyebar memenuhi permukaan cawan dan membentuk *lamellipodia* serta *filopodia* berukuran besar. Akibatnya, luas ukuran morfologi ADSCs kelompok FBS lebih besar dibandingkan kelompok PRP. Suplementasi PRP dalam medium kultur ADSCs donor DM meremajakan ADSCs sehingga terjaga pada ukuran normal dan teramati lebih sehat yang ditandai dengan bentuk morfologi seperti fibroblas (Gambar 2).

Pada prinsipnya, ADSCs dengan densitas kultur awal yang sedikit akan mendorong sel untuk melakukan ekstrapenjuluran agar dapat berinteraksi dengan sel lainnya sehingga ukuran sel menjadi lebih besar sebagai tanda dari penuaan sel seperti yang terjadi pada kelompok FBS. Penuaan sel adalah kondisi keadaan metabolik sel berubah baik secara *in vitro* maupun *in vivo* yang ditandai dengan perubahan morfologi sel, metabolisme, dan ekspresi gen (Dulic, 2013). Perubahan morfologi akibat penuaan sel umumnya ditandai dengan peningkatan volume ukuran sel dan bentuknya menjadi tidak beraturan serta sel mulai kehilangan kemampuan proliferasinya. Fenomena ini pertama kali dijelaskan oleh Leonard Hayflick pada tahun 1960 yang dikenal sebagai fenomena Hayflick (Rochette & Brash, 2010).

Pada studi ini, nutrisi yang digunakan merupakan nutrisi standar untuk mendukung pertumbuhan sel punca yaitu FBS. Oleh karena itu, penuaan sel diduga tidak hanya akibat rendahnya interaksi antarsel namun juga karena sumber sel yang berasal dari donor diabetes melitus tipe 2.

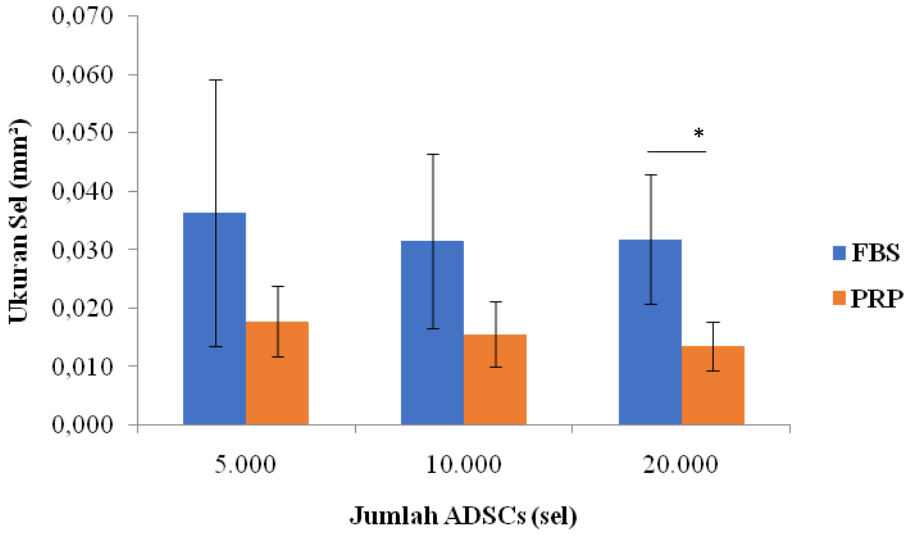


Gambar 1. Morfologi ADSCs P3 yang dikultur selama 32 jam menggunakan medium mengandung FBS (A,C,E) dan PRP (B,D,F) dengan jumlah sel awal yang dikultur sebanyak 5,000 sel (A-B), 10,000 sel (C-D) dan 20,000 sel (E-F) (bar = 200 µm)



Gambar 2. Morfologi ADSCs P3 yang dikultur menggunakan medium mengandung FBS (A) dan PRP (B) yang menempel dan mengalami *spreading* dengan densitas kultur awal sel sebanyak 5,000 sel selama 32 jam; Lingkar putus-putus warna merah adalah inti sel (nukleus), panah warna hijau adalah *lamellipodia*; panah warna kuning adalah *filopodia*; panah biru adalah sel yang belum mengalami *spreading* (bar = 100 µm)

Sel-sel yang mengalami penuaan lebih banyak ditemukan pada ADSCs dengan jumlah sel kultur yang sedikit pada kelompok FBS. Sebaliknya, ADSCs yang dikultur pada medium mengandung PRP dari donor yang sama menunjukkan morfologi yang lebih sehat meskipun jumlah densitas sel yang dikultur lebih sedikit (5,000 sel). Hasil tersebut diduga karena tingginya kadar protein pertumbuhan yang terkandung dalam PRP.



Gambar 3. Ukuran morfologi ADSCs P3 yang dikultur selama 32 jam dengan variasi jumlah kultur awal dalam medium mengandung FBS dan PRP; Perhitungan diambil dari 35 ADSCs (*p <0,05)

Kadar protein pertumbuhan yang tinggi terkandung pada PRP diduga mengakibatkan sel menjadi lebih aktif berproliferasi dan menjaga ukuran sel pada ukuran normal dan sel teramati lebih sehat. Hal tersebut dibuktikan berdasarkan rerata data kuantitatif luas ukuran morfologi ADSCs dengan variasi densitas kultur (Gambar 3). Densitas kultur awal sebanyak 5,000 pada ADSCs dalam medium mengandung FBS (0,036 mm²) lebih besar ukuran morfologi *spreding* ADSCs dibandingkan jika densitas kultur sel awal ketika ditingkatkan menjadi 10,000 atau 20,000 sel (0,032 mm² atau 0,032 mm²). Hasil dengan kecenderungan serupa juga ditunjukkan pada ADSCs yang dikultur menggunakan medium PRP. Semakin besar densitas kultur awal maka semakin kecil luas morfologi ADSCs (20,000 = 0,014 mm²; 10,000 = 0,016 mm²; 5,000 = 0,018 mm²) namun perbedaannya tidak bermakna. Luas ukuran morfologi ADSCs yang dikultur menggunakan FBS jauh lebih besar dibandingkan PRP dan berbeda bermakna pada densitas jumlah sel awal yang dikultur sebanyak 20,000 sel (p <0,05). Hal ini menunjukkan bahwa PRP memiliki potensi bagi ADSCs asal donor diabetes untuk meremajakan dan memperbaiki kualitas pertumbuhan ADSCs agar tidak mengalami penuaan (*senescent*) dini.

SIMPULAN

Ukuran morfologi *adipose-derived stem cells* (ADSCs) dari donor diabetes melitus tipe 2 yang dikultur menggunakan medium mengandung *platelet-rich plasma* (PRP) dengan densitas kultur awal sebanyak 20,000 sel teramati lebih kecil (normal) secara signifikan dibandingkan dengan ADSCs yang dikultur menggunakan medium mengandung *fetal bovine serum* (FBS).

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada donor yang telah bersedia secara sukarela memberikan limbah lemak untuk digunakan pada studi ini.

DAFTAR PUSTAKA

Araki, J., Jona, M., Eto, H., Aoi, N., Kato, H., Suga, H., Doi, K., Yatom,i Y & Yoshimura, K. (2011). Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Engineering Part C: Methods. 18(3): 176-185.* Doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0308.

Atashi. F., Jaconi, M. E., Pittet-Cuenod, B & Modarressi, A. (2014). Autologous Platelet-Rich Plasma: A Biological Supplement to Enhance Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Expansion. *Tissue Engineering Part C Methods. 21(3): 253-262.* Doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0206.

Blande, I., Bassaneze, V., Lavini-Ramos, C., Fae, K., Kali,l J., Miyakawa, A., Schettert, I & Krieger, J. 2009. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium

supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion.* 49(12): 2680-2685. Doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02346.

Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M.B & Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation?. *Biomaterials. 76: 371-387.* Doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065.

Dulic, V. (2013). Senescence regulation by mTOR. *Cell senescent. 965:15-35.* Doi: 10.1007/978-1-62703-239-1_2.

Guo, J., Hu, H., Gorecka, J., Bai, H., He, H., Assi, R., Isaji, T., Wang, T., Setia, O., Lopes, L & Gu Y. (2018). Adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate diabetic wound healing in a similar fashion as bone marrow-derived cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology, 315(6): C885-896.* Doi: 10.1152/ajpcell.00120.

Horwitz, R & Webb, D. (2003). Cell migration. *Current Biology. 13(19): 756-759.* Doi: 10.1002/cphy.c110012

Kandoi, S., Patra, B., Vidyasekar, P., Sivanesan, D., Vijayalakshmi, S., Rajagopal, K & Verma, R.S. (2018). Evaluation of platelet lysate as a substitute for FBS in explant and enzymatic isolation methods of human umbilical cord MSCs. *Scientific reports. 8(1): 1-12.* DOI: 10.1038/s41598-018-30772-4.

Kocaoemer, A., Kern, S., Klüter, H & Bieback, K. (2007). Human AB serum and thrombin activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem cells. 25(5): 1270-1278.* Doi: 10.1634/stemcells.2006-0627.

Munro, J., Barr, N.I., Ireland, H., Morrison, V & Parkinson, E.K. (2004). Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Experimental cell research. 295(2):525-538.* Doi: 10.1016/j.yexcr.2004.01.017

Nicoletti, G.F.De, Francesco, F., D'Andrea, F & Ferraro, G.A. (2015). Methods and procedures in adipose stem cells: state of the art and perspective for translation medicine. *Journal of cellular physiology. 230(3): 489-495.* Doi: 10.1002/jcp.24837

Pavlovic, V., Ciric, M., Jovanovic, V & Stojanovic, P. (2016). Platelet rich plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open Medicin. 11(1): 242-247.* Doi: 10.1515/med-2016-0048

Rochette, P.J & Brash, D.E. (2010). Human telomeres are hypersensitive to UV-induced DNA Damage and refractory to repair. *PLoS Genetics. 6(4): 1-13.* Doi: 10.1371/journal.pgen.1000926

Shen, J., Gao, Q., Zhang, Y & He Y. (2015). Autologous platelet-rich plasma promotes proliferation and chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Molecular medicine reports. 11*(2): *1298-1303.* https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2875.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P. De., Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P & Hedrick MH. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular biology of the cell. 13(12): 4279-4295.* Doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105

Zuk, P.A. (2010). The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. *Molecular biology of the cell. 21, 1783-1787.* Doi: 10.1091/mbc.E09-07-0589.