

Isolasi Sel Punca Pluripoten dengan Penanda CD105⁺ dan SSEA3⁺ dari Sel Fibroblas Kulit asal Jaringan Preputium

(Isolation of The Pluripotent Stem Cells of Human Dermal Fibroblast Derived from Preputium Tissue using Cd 105⁺ and Ssea3⁺ Markers)

CHURIYAH¹, INDRA KUSUMA², SISKA A. KUSUMASTUTI¹,
RESTU SYAMSUL HADI², AGUNG ERU WIBOWO¹, FAIZA KARA FABIOLA¹

1Pusat Teknologi Farmasi dan Biomedika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi,
Kawasan Puspitek, Serpong, Banten.

2Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jl Letjen Supraptor Cempaka Putih
Jakarta Pusat 10510.

Diterima 30 Februari 2015, Disetujui 16 Agustus 2016

Abstrak: Perkembangan penelitian dan pengetahuan tentang sel punca terus meningkat, kini sel punca berpeluang menjadi terapi modern dengan pendekatan regeneratif yang memberi harapan kesembuhan untuk berbagai jenis penyakit yang sulit untuk disembuhkan seperti penyakit genetik, degeneratif, trauma dan keganasan. Tujuan penelitian ini adalah melakukan isolasi sel punca pluripoten dari sel fibroblas kulit asal jaringan preputium secara enzimatik dan eksplan yang dilanjutkan dengan karakterisasi penanda khas *cluster differentiation* (CD) 105 dan *surface-stage embryonic antigen* (SSEA)-3 menggunakan sistem pemurnian berbasis magnet (MACS). Hasil isolasi sel fibroblast secara enzimatik maupun eksplan diperbanyak secara kultur ekspansi dengan variasi medium dan pasase sel serta dikarakterisasi untuk mendapatkan subpopulasi sel dengan CD 105⁺ dan SSEA3⁺. Penggunaan *conditioned medium*, tingkat pasasi yang rendah dan konfluensi yang tinggi meningkatkan persentase subpopulasi sel CD105⁺ dibandingkan dengan medium standar, tingkat pasase yang lebih tinggi dan konfluensi yang lebih rendah. Subpopulasi sel CD 105⁺ dan SSEA3⁺ yang dikultur dan diekspansi menampakkan respon terhadap pewarna Alkalin fosfatase yang menunjukkan adanya populasi *stem cell*.

Kata kunci: sel fibroblas, sel punca CD105⁺, sel punca SSEA3⁺, alkalin fosfatase.

Abstract: The development and knowledge of stem cell research are growing quickly. Stem cells are now likely to become a modern treatment as a regenerative approach that has potential treatment for various diseases that are difficult to cure, such as genetic diseases, degenerative, trauma, and malignancy. The aimed of this study was to isolate pluripotent stem cells using human dermal fibroblast cell obtained from preputium tissue by enzymatic and tissue explants methods, followed by double positive characterization for specific markers of cluster differentiation (CD) 105 and surface-stage embryonic antigen (SSEA)-3 using magnetic-based purification system (MACS). The fibroblast cells resulted from both method were cultured and expanded by variations medium and passage cells, then were characterized for double positive CD 105⁺ and SSEA3⁺. Fibroblast cell culturing in conditioned medium, lower passage and higher density has the highest percentage of CD105⁺ subpopulation cells compared than fibroblast cell in standard medium, higher passage and lower density. Subpopulation of both of CD 105⁺ and SSEA3⁺ cells revealed a positive response to alkaline phosphatase dye which proving a population of stem cells.

Keywords: fibroblasts, CD105⁺ stem cells, SSEA3⁺ stem cells, alkaline phosphatase.

PENDAHULUAN

DALAM beberapa dekade terakhir ini penelitian dan pengetahuan tentang sel punca terus meningkat pesat. Sel punca mempunyai potensi regeneratif yang tinggi, karena dapat berdiferensiasi menjadi sel yang spesifik dan mempunyai kemampuan untuk memperbaharui diri atau beregenerasi melalui pembelahan sel. Dengan demikian sel punca berpeluang menjadi terapi modern melalui pendekatan regeneratif yang memberi harapan kesembuhan berbagai jenis penyakit yang sulit untuk disembuhkan seperti penyakit genetik, degeneratif, trauma dan keganasan^(1,2).

Pada awalnya terapi sel punca banyak menggunakan sel punca embrional yang menggunakan embrio sebagai sumber sel. Mengingat adanya faktor keamanan dan masalah etik dalam pengambilan embrio sebagai sumber sel, maka dikembangkan jenis sel punca baru yaitu sel punca dewasa (*Adult stem cells*) dan *induced Pluripotent Stem Cells* (iPSC) atau sel punca pluripoten^(3,4). Sel punca pluripoten adalah sel yang telah mengalami pemrograman ulang dan memiliki karakteristik menyerupai sel punca embrional yaitu belum berdiferensiasi dan mempunyai kemampuan untuk berkembang menjadi berbagai jenis sel yang spesifik dari ketiga lapisan germinal yaitu ektoderm, mesoderm dan endoderm dan berbagai jaringan tubuh. Sel punca pluripoten ini terdiri dari 3 jenis yaitu sel punca embrional, *induced-pluripotent stem cells* (iPSC) dan sel muse (*multilineage differentiating stress enduring*). Dari ketiga jenis sel punca embrional tersebut sel muse terutama diperoleh dari sel-sel mesenkimal, antara lain sel fibroblast⁽⁵⁾.

Sel fibroblas merupakan sel yang paling umum ditemui pada jaringan ikat dan sel ini mensintesis beberapa komponen matriks ekstraseluler seperti kolagen, retikuler dan elastin. Selain itu juga mensintesis makromolekul anionik yaitu glikosaminoglikans dan proteoglikans serta glikoprotein multiadesif laminin dan fibronectin yang dapat mendorong perlekatan sel pada substrat. Kultur *in vitro* sel-sel fibroblas dilaporkan mensekresikan sekitar 175 jenis protein, diantaranya adalah sitokin dan beberapa faktor pertumbuhan seperti *basic fibroblas growth factor* (bFGF/FGF2) yang mampu menstimulasi proliferasi sel dan menghambat diferensiasi sel. Medium yang mengandung sekreta FGF2 yang dihasilkan oleh sel sel fibroblas dikenal dengan *conditioning medium*, dan dapat digunakan untuk mempertahankan pluripotensi sel punca embrionik⁽⁶⁾.

Indonesia sebagai negara dengan mayoritas penduduknya memeluk agama islam secara rutin melakukan khitan kepada anak-anak laki. Dari

proses khitan ini terdapat sampah medis yaitu preputium yang cukup banyak, dimana preputium ini bisa dijadikan sebagai sumber sel fibroblas^(7,8). 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⁽⁹⁾. Tujuan penelitian adalah melakukan isolasi sel punca mesenkimal dan sel punca pluripoten dari sel fibroblas asal jaringan preputium secara immunomagnetik. Selanjutnya dilakukan karakterisasi menggunakan penanda CD105 untuk sel punca mesenkima dan SSEA3 untuk sel punca pluripoten serta dan pewarnaan dengan alkanin fosfatase.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan penelitian terdiri dari kulit preputium dari sampah sunat, *Phosphate buffer saline* (PBS), Penisilin-Streptomycin, povidone iodine, Etanol 70%, Fungizone, medium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) Foetal Bovine Serum (FBS). Dispase II, Collagenase type I, tripsin-EDTA, tripan biru, CD 105, SSEA3, alkanin fosfatase (ALP) dan formaldehid. Sedangkan peralatan yang digunakan meliputi *laminar air flow cabinet*, lemari pendingin, centrifuse, incubator CO2, mikroskop inverted, vortex, cawan petri 100 mm, cawan petri 35 mm, tabung falcon 50 ml, pinset, gunting, pisau bedah, *cell strainer*, haemositometer, perangkat MACS (*magnetic activated cell sorting*).

METODE. Isolasi Sel Fibroblas dari Kulit Preputium Dekontaminasi dan Preparasi Sampel. Sampel kulit preputium segar disimpan dalam PBS yang mengandung 1% antibiotik Penisilin-streptomisin dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 1 jam. Selanjutnya sampel kulit direndam dalam povidone iodine selama 2 menit, sebanyak 2 kali, kemudian direndam dalam EtOH 70% selama 2 menit sebanyak 2 kali. Sampel yang telah didekontaminasi dipindahkan kedalam medium kultur DMEM yang ditambah dengan FBS 10% dan 1% antibiotik penisilin-streptomisin dan antimikotik fungizon. Selanjutnya sampel dipindahkan kedalam cawan petri yang diisi dengan 5 ml PBS, dengan posisi sisi dermis disebelah atas dan sisi epidermis di bawah. Bekuan darah dan jaringan lemak yang menempel pada sampel dihilangkan, kemudian kulit dibalikkan sehingga sisi epidemis diatas dan sisi dermis dibawah, lalu dibuat potongan kulit dengan ukuran 0,5-1 cm x 1,5-2 cm.

Isolasi Sel secara Enzimatik. Potongan sampel

kulit dipindahkan kedalam cawan petri yang diisi dengan enzim dispase II konsentrasi 1 unit/ml hingga terendam, diinkubasi selama 22 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan pemisahan antara lapisan dermis dari lapisan epidermis. Jaringan dermis yang diperoleh dikumpulkan didalam tabung falcon yang berisi PBS. Kemudian jaringan dermis dipindahkan kedalam cawan petri baru yang steril dan dipotong-potong sampai halus, dan diinkubasi selama 2 jam didalam enzim kolagenase type I konsentrasi 200 unit/ml pada suhu 37 °C selama 2 jam, dengan divortex ringan setiap 15 menit. Suspensi sel yang didapat dilewatkan pada *cell strainer* 70 µm, kemudian disentrifugasi pada 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet sel diresuspensi dalam medium komplit dan dihitung menggunakan haemositometer dengan pewarnaan tripan biru, kemudian sel ditanam dengan densitas 100.000/cm². Penggantian medium dilakukan setiap 2-3 hari, dan setelah kultur mencapai 80% konfluensi dipasasi dengan trypsin/EDTA 0,05%.

Isolasi Sel secara Eksplan. Potongan jaringan dermis ditanam di dalam cawan kultur dengan jarak 5 mm satu sama lain, dan ditambahkan medium dalam jumlah minimal untuk menjaga agar potongan jaringan tidak mengambang tetapi setiap potongan jaringan mendapatkan sedikit medium disekitarnya. Kultur disimpan dalam inkubator pada suhu 37 °C dan 5% CO₂ semalam. Hari berikutnya ditambahkan medium sebanyak dua kali dari jumlah sebelumnya. Demikian seterusnya medium ditambahkan secara bertahap sampai dengan hari ke-3, sehingga potongan jaringan dermis yang telah melekat dengan kuat pada dasar cawan kultur terendam oleh medium. Pengamatan dilakukan terhadap munculnya pertumbuhan sel (*outgrowth*) di sekitar eksplan. Apabila pertumbuhan sel disekitar eksplan telah mencapai minimal 50% konfluensi dilakukan pasasi dengan trypsin/EDTA 0,05%. Suspensi sel dipindahkan kedalam cawan kultur baru dengan densitas sel 10.000/cm², diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂. Medium kultur diganti setiap 2-3 hari dengan medium baru dan dipasasi setiap 6-7 hari atau setelah kultur mencapai konfluensi 70%.

Pembuatan *Conditioning Medium*. Kultur sel fibroblas yang telah mencapai konfluensi 70% dibuang mediumnya, kemudian dicuci dengan PBS dan diganti dengan medium DMEM baru tanpa penambahan FBS. Kultur diinkubasi selama 2 (dua) hari dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan CO₂ 5%. Kemudian medium dikoleksi dan digunakan sebagai *conditioning medium*⁽¹⁰⁾.

Isolasi sel punca secara separasi immunomagnetik. Isolasi sel punca mesenkimal dengan penanda CD 105. Sel fibroblas yang telah

di panen diinkubasi dengan antibodi 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 antibodi CD105 kemudian dilewatkan pada kolom tipe MS pada magnet MACS separator. Sel yang berikatan dengan antibodi akan tertahan dalam medan magnet dalam kolom MS sementara sel yang tidak berikatan dengan antibodi atau sel CD105 negatif akan terpisah dan terlepas dari kolom. Sel CD105 positif kemudian dilepaskan dari medan magnet dan dielusi dengan PBS untuk mendapatkan fraksi positif CD 105. Jumlah sel masing-masing kemudian dihitung menggunakan hemocytometer dengan pewarnaan *tryphan-blue*. Prosentase subpopulasi sel CD 105⁺ kemudian dibandingkan berdasarkan tingkat pasasi sel, jumlah sel, jenis medium dan pemurnian serial.

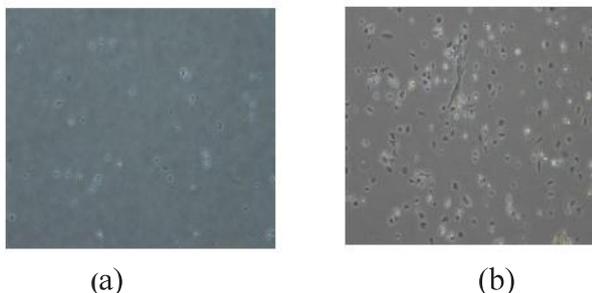
Isolasi Sel Punca Pluripoten dengan Penanda SSEA3. Sel fibroblas yang telah di panen dan dihitung jumlahnya diinkubasi dengan penanda khas SSEA3 perbandingan 1:50 (10 µl SSEA3⁺ dalam 500 µL sel), dengan jumlah sel 1.000.000/100 µL, diinkubasi didalam es selama 1 jam disertai dengan resuspensi sel setiap 10 menit. Sel dikonjugasikan dengan antibodi sekunder FITC perbandingan 1:100 (5 µL FITC dalam 500 µl suspensi sel) dengan waktu inkubasi selama 1 jam didalam es yang disertai dengan resuspensi sel tiap 10 menit. Sel yang sudah terkonjugasi dengan FITC kemudian dikonjugasikan dengan butiran besi-mikro (*microbeads*) anti-FITC selama 30 menit pada suhu 4°C sesuai petunjuk dari produsen (Miltenyi). Fibroblas yang telah terkonjugasi dengan anti-FITC kemudian dilewatkan pada kolom tipe MS pada magnet MACS separator. Sel yang berikatan dengan anti-FITC akan tertahan dalam medan magnet dalam kolom MS sementara sel yang tidak berikatan dengan anti-FITC atau sel SSEA3 negatif akan terpisah dan terlepas dari kolom. Sel positif SSEA3 kemudian dilepaskan dari medan magnet dan dielusi dengan bufer PBS untuk mendapatkan fraksi positif. Jumlah sel masing-masing kemudian dihitung menggunakan hemocytometer dengan pewarnaan *tryphan-blue*. Subpopulasi sel SSEA3⁺ kemudian dihitung persentasenya dan selanjutnya dikulturkan.

Pewarnaan Sel Punca dengan Alkaline Phosphatase. Kultur sel SSEA3⁺ dan CD105⁺ dilakukan fiksasi terlebih dahulu dengan Paraformaldehid 4%. Selanjutnya dicuci dengan bufer pencuci (*rinse buffer*) yang terdiri dari Tween20, NaCl dan Tris HCl dilakukan sebanyak 2 kali dan dilakukan pewarnaan menggunakan alkanin fosfatase. Kemudian diinkubasi selama 15 menit pada keadaan gelap dan diamati dibawah mikroskop. Koloni sel berwarna merah pada kultur menunjukkan adanya

populasi sel punca pluripoten.

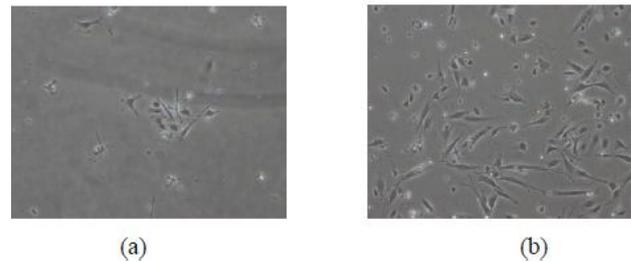
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Sel Fibroblas dari Kulit Preputium. Isolasi sel fibroblas dari kulit preputium menggunakan dua metode yaitu metode enzimatik dan metode eksplan. Proses dekontaminasi dengan beberapa antibiotik mampu menghilangkan kontaminan yang terdapat pada kulit preputium. Pada isolasi metode enzimatik, perendaman dalam larutan enzim dispase II membantu mempermudah terlepasnya jaringan epidermis dan dermis, dengan demikian sel fibroblas yang diisolasi dari jaringan dermis lebih murni. Sedangkan enzim kolagenase berfungsi mendigesti antara sel yang satu dengan sel yang lain sehingga dapat memisahkan sel fibroblas dari sel lainnya. Inkubasi potongan jaringan dermis dengan enzim kolagenase merupakan tahap paling penting dalam proses isolasi, karena sel-sel yang berada di jaringan dermis terlepas menjadi sel tunggal (*single cell*) selama proses inkubasi. Semakin keruh larutan sel, maka semakin banyak sel yang terlepas. Penggunaan *cell strainer* dapat memperbanyak pelepasan sel fibroblas dari jaringan dermis. Hasil isolasi sel fibroblas dengan metode enzimatik tercantum dalam Gambar 1.



Gambar 1. Sel hasil isolasi fibroblas dengan metode enzimatik: (a) hari ke-2 setelah isolasi, (b) hari ke-5 setelah isolasi.

Proses isolasi dengan metode eksplan lebih sederhana dan singkat dibandingkan dengan proses isolasi dengan metode enzimatik. Hal penting dalam metode eksplan antara lain jarak penempatan masing-masing potongan jaringan dermis didalam cawan kultur tidak terlalu dekat dan tidak terlalu jauh. Selain itu pemberian medium kultur yang dilakukan secara bertahap setiap hari adalah agar semua bagian eksplan terkena media tetapi eksplan tidak mengambang. Pada hari kedua setelah penanaman eksplan terjadi pertumbuhan sel fibroblas disekitar potongan jaringan dermis yang melekat pada dasar cawan kultur. Hasil isolasi sel fibroblas tercantum pada Gambar 2.



Gambar 2. Sel hasil isolasi fibroblas dengan metode explan: (a) hari ke-2 setelah isolasi, (b) hari ke-5 setelah isolasi

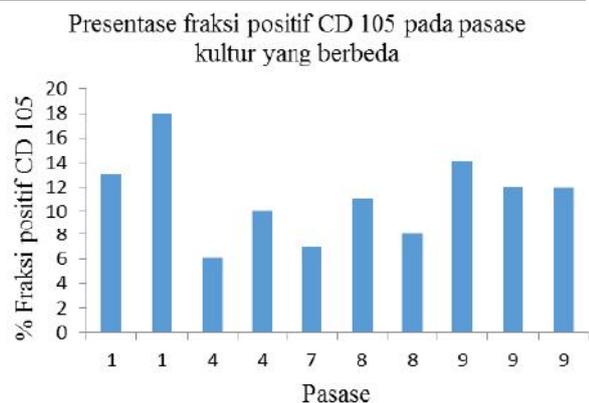
Isolasi Sel Punca secara Separasi Immunomagnetik. Metode isolasi sel selanjutnya adalah berdasarkan molekul penanda pada permukaan sel yang bertujuan untuk mendapatkan fraksi sel spesifik dengan separasi secara immunomagnetik. Prinsip dari metode ini antara lain melalui reaksi pemisahan berdasarkan kompleks antara antigen dan antibodi. Antigen yang digunakan dalam metode ini adalah molekul penanda permukaan yaitu penanda CD 105 untuk sel punca mesenkimal dan penanda SSEA3 untuk sel punca pluripoten, dan antibodi yang spesifik terhadap antigen yang digunakan berada dalam keadaan terikat dengan magnetik *microbeads*. CD105 adalah membran glikoprotein tipe 1 yang terletak pada permukaan sel dan merupakan bagian dari kompleks beta reseptor TGF⁽¹⁾.

Dalam metode ini pemisahan dilakukan dalam medan magnet menggunakan beberapa perangkat instrumen yaitu magnetik *microbeads* beserta perangkat separasi yaitu kolom dan separator. Kolom disisipkan di antara separator yang merupakan medan magnet kuat, sehingga sel dengan antigen yang sudah diikat oleh antibodi pada *microbeads* akan tertahan dikolom dan dipisahkan dari sel tanpa antigen. Dari proses ini diperoleh fraksi sel positif CD105 yaitu fraksi sel punca mesenkimal dan fraksi sel positif SSEA3 yakni sel punca pluripoten.

Isolasi sel punca mesenkimal dengan penanda CD 105 secara separasi immunomagnetik dilakukan beberapa kali dari kultur ekspansi sel fibroblas dengan jumlah sel, tingkat pasase dan medium kultur yang berbeda (Tabel 1) pada umur kultur 7-10 hari dengan konfluensi 80-90%. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa semua kultur menunjukkan adanya fraksi sel punca mesenkimal yang mengekspresikan penanda CD105. Perbedaan pasasi kultur menghasilkan persentase fraksi positif yang berbeda-beda tetapi tidak membentuk pola. Pasase awal kultur fibroblas pada medium pertumbuhan DMEM (P.1) memperlihatkan persentase fraksi positif CD 105 lebih tinggi dibandingkan dengan pasase tengah (P.4) dan pasase akhir (P.7 dan P.9) seperti tercantum pada Gambar 3.

Tabel.1 Hasil isolasi sel punca mesenkimal dengan penanda CD105 secara separasi immunomagnetik, dengan jumlah sel, pasase kultur dan perlakuan/medium yang berbeda.

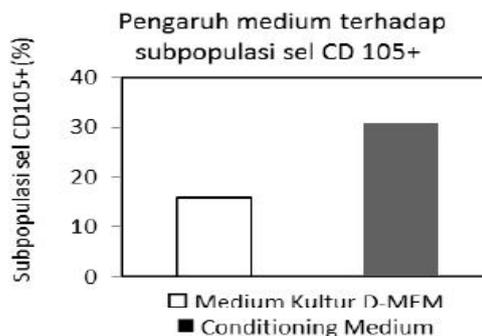
No.	Σ sel (10 ⁵)	(%) Fraksi positif	Σ sel Fraksi positif (10 ⁵)	Pasase kultur	Perlakuan/medium
1	26	13.5	3.51	1	D-MEM
2	26	18.2	4.732	1	D-MEM
3	5.8	32.1	1.862	1	Conditioning medium
4	37.8	6.6	2.495	4	D-MEM
5	12.6	10.3	1.298	4	MEM-
6	25	7.4	1.85	4	D-MEM
7	14.9	11.8	1.758	7	Pemurnian serial
8	14.9	8.6	1.281	8	Pemurnian serial
9	11	14.8	1.628	9	D-MEM
10	11	12.4	1.364	9	D-MEM
11	5.8	29.7	1.723	9	Conditioning medium
12	25.6	12	3.072	9	Pemurnian serial



Gambar 3. Pengaruh perbedaan pasase kultur terhadap persentase subpopulasi sel CD 105⁺ dalam pemurnian secara immunomagnetik.

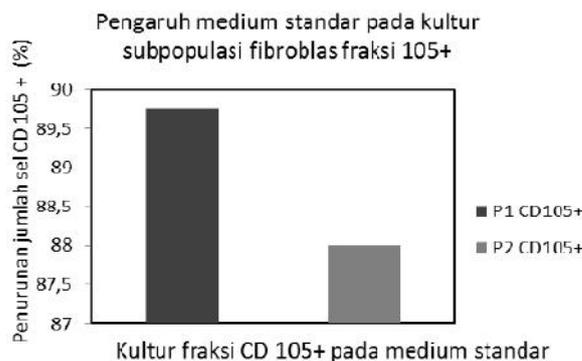
Selain itu, perbedaan medium pertumbuhan kultur baik menggunakan medium DMEM maupun Alpha MEM pada pasase yang sama juga tidak menunjukkan perbedaan persentase fraksi positif yang signifikan. Sedangkan penggunaan conditioning medium menghasilkan prosentase fraksi positif yang relatif tinggi hingga dua kali lipat (Gambar 4) jika dibandingkan dengan medium kultur D-MEM

Pemurnian secara serial dilakukan dengan menanam ulang fraksi positif yang diperoleh dalam medium kultur sebanyak dua kali lalu dimurnikan kembali. Pada tabel 1 dan gambar 5 tampak bahwa penggunaan medium kultur menyebabkan penurunan prosentase subpopulasi CD105 sekitar 85%.



Gambar 4. Pengaruh perbedaan medium terhadap persentase subpopulasi sel CD 105⁺ dalam pemurnian secara MACS.

Penurunan ekspresi CD105 diduga terjadi akibat diferensiasi spontan karena pengaruh serum (FBS) dalam medium. Karakterisasi sel punca mesenkimal menggunakan penanda permukaan CD 105 juga dilakukan peneliti lain sebelumnya pada sel punca mesenkimal asal jaringan lemak⁽¹²⁾.

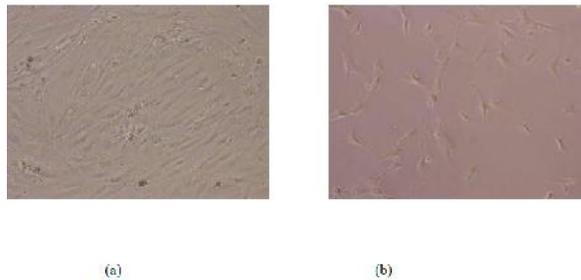


Gambar 5. Kultur subpopulasi CD105⁺ dalam medium kultur DMEM dan FBS 10% pada pasase 1 (P1) dan pasase 2 (P2).

Dari hasil penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan pada penggunaan *conditioning medium* yang mengandung sekreta sel punca terhadap pertumbuhan sel punca dan pencegahan diferensiasi spontan dengan metoda autokrin. Sekreta yang dikeluarkan sel punca bekerja pada reseptor permukaan sel untuk mengatur tingkat proliferasi dan diferensiasi sel. Hasil ini sesuai dengan yang ditemukan pada sel punca asal sumsum tulang^(13, 14). Penggunaan *conditioning medium* sel punca mesenkimal pada kultur hepatosit juga terbukti mengurangi apoptosis akibat induksi dengan karbon tetraklorida⁽¹⁵⁾.

Isolasi sel punca pluripoten dari sel fibroblas dengan penanda SSEA3 secara separasi immuno magnetik dilakukan dengan jumlah sel sebanyak 8.000.000 sel/mL. Hasil separasi diperoleh fraksi sel SSEA3⁺ yang sangat rendah yaitu sebanyak 38.888 sel/mL atau sekitar 0,5% dari jumlah sel fibroblas yang diseparasi. Rendahnya persentase sel punca

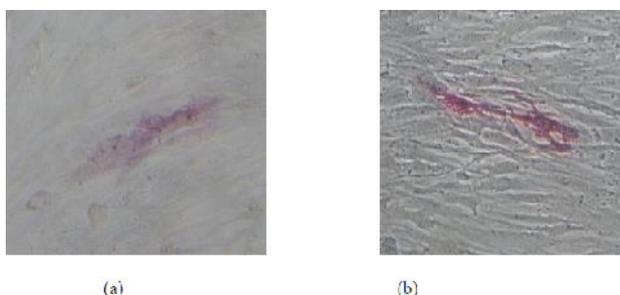
SSEA3⁺ kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain banyaknya sel fibroblas yang sudah terdiferensiasi akibat penggunaan FBS dalam kultur dan tidak digunakannya *conditioning medium* dalam kultur ekspansi sel fibroblas. Sel yang diperoleh dari separasi immunomagnetik baik CD105⁺ maupun SSEA3⁺ kemudian dikulturkan lebih lanjut dan diekspansi didalam 24 well plate (Gambar 6).



Gambar 6. Kultur sel hasil isolasi secara immunomagnetik dengan penanda permukaan CD 105 dan SSEA3 yang sudah dikulturkan selama 8 hari : (a) subpopulasi mesenchymal stem cell CD 105+ (b) Subpopulasi sel punca pluripoten SSEA3⁺.

Pewarnaan *Alkaline Phosphatase (ALP)*.

Pewarnaan ALP dilakukan terhadap subpopulasi sel punca positif CD 105 dan subpopulasi sel positif SSEA3 untuk mengetahui pluripotensi dari kedua subpopulasi sel punca tersebut. Sel yang berwarna merah adalah sel yang positif terhadap ALP dan mengindikasikan sifat pluripotensi dan tingkat proliferasi yang tinggi. Warna merah pekat pada kultur sel punca positif SSEA3 menunjukkan adanya koloni sel punca yang cukup banyak sedangkan warna merah pucat pada kultur sel punca positif CD105 memperlihatkan mulai sedikitnya jumlah sel punca positif CD105 diduga karena adanya proses diferensiasi (Gambar 7).



Gambar 7. Pewarnaan menggunakan alkalin fosfatase pada kultur sel punca: (a) positif CD105, (b) positif SSEA3, yang diamati dibawah mikroskop perbesaran 20x

Hal yang sama pada penelitian sel punca mesenchymal dari sumsum tulang yang menunjukkan rendahnya sel yang positif terhadap alkalin fosfatase⁽⁶⁾. Alkalin fosfatase diekspresikan pada sel yang berproliferasi

dan metabolisme tinggi.

SIMPULAN

Kultur sel fibroblas berhasil diisolasi dari jaringan kulit preputium melalui isolasi secara metode enzimatik dan metode eksplan. Sel punca mesenchymal dan sel punca pluripoten dapat diperoleh dari kultur fibroblas melalui separasi secara immuno magnetik dengan penanda CD 105 dan SSE3. Sel punca mesenchymal positif CD 105 dan sel punca pluripoten positif SSEA3 dibuktikan dengan adanya warna merah pada pewarnaan Alkalin fosfatase.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Kemenristek Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui Riset Inovasi Nasional tahun 2015.

DAFTAR PUSTAKA

1. Shukla VK, Tiwary SK, Barnwal S, Gulati AK, Pandey SS. Effect of autologous epidermal cell suspension transplantation in chronic nonhealing wounds: a pilot study. *Canadian J Surgery*. 2010.53(1):6-13.
2. Gurudutta G, Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Tripathi R. Stem cell therapy: a novel & futuristic treatment modality for disaster injuries. *The Indian J Med Res*. 2012.153(1):15-23.
3. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wyszczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W, et al. Hunt for pluripotent stem cell regenerative medicine search for almighty cell. *J Autoimmun*. 2012. 30(3):151-62.
4. Kusuma I, Ibrahim N. Induksi sel somatic menjadi sel punca pluripoten. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2011. 38(5).
5. Simerman AA, Marcelo MJ, Gimeno ML, Dumesic DA, Chazenbalk GD. A mystery unraveled: nontumorigenic pluripotent stem cells in human adult tissues. *Expert opin biol ther*. 2014. 14(7): 917-29.
6. Djuwita I, Harlystiarini, Widyaputri T, Efendi A, Kaiin EM, Nurhidayat. Tingkat pertumbuhan dan analisa protein sel-sel fibroblas fetal tikus hasil kultur in vitro. *Majalah Ilmu Kehewan Indonesia*. 2010;1(2): 9-16
7. Kusuma I, & Hadi RS. Geraniin supplementation increases human keratinocyte proliferation in serum-free culture. *Univ Med*. 2013. 32(1):3-10.
8. Hadi RS, Kusuma I, Sandra Y. Allogeneic human dermal fibroblast are viable in peripheral blood mononuclear co-culture. *Univ Med*. 2014. 33(2):34-42
9. Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, Dezawa M. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nat Protoc*. 2013. 8(7):1391-415.
10. Chowdhury SR, Aminuddin BS, Rusziah BHI. Effect

- of supplementation of dermal fibroblast conditioned medium on expansion of keratinocyte through enhancing attachment Indian J Exp Biol. 2012. 50: 332-9
11. Sardjono CT, Setiawan M, Frisca1, Saputra V, Aniko G, Sandra F. Application of a modified method for stem cell isolation from lipoaspirates in a basic lab. Med J Indonesia. 2009; 18:91-6.
 12. Laksmiawati DR, Pawitan JA, Sadikin M, Sardjono CT. Peningkatan kadar immunosupresan IDO (Indoleamin 2,3-dioksigenase) pada supernatan kultur sel punca mesenkim yang distimulasi dengan agregat imunoglobulin G. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 12(1):50-56.
 13. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, et al. Multilineage differentiating stress- enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci. 2011.108(24):9875-80.
 14. Efendi, A. Pengaruh conditioned medium rat embryonic fibroblast (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 (Skripsi) Bogor. Institut Pertanian Bogor. 53p.
 15. Xagorari A, Siotou E, Yiangou M, Tsolaki E, Bougiouklis D, Sakkas L, et al. Achilles Anagnostopoulos : Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. Int J Clin Exp Pathol. 2013. 6(5):831-40.