ANALISIS PROTEIN PADA MEDIUM TERKONDISI SEL PUNCA MESENKIMAL

Reysa Pradifta¹⁾, Marlina¹⁾, dan Henny Lucida³⁾

Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat

E-mail: reysapradifta@yahoo.com

ABSTRACT

Problems: Mesenchymal stem cells (MSC) are the most abundant cells that make up the stromal organs of the spinal cord. MSCs have the ability to self-renew to a sufficient amount to heal wounds. The medium in which undifferentiated MSCs grow is called mesenchymal stem cell-conditioned medium (MSC-CM) and has an MSC-like effect. **The Aim Of The Research:** In this study, an analysis of the protein content contained in MSC-CM was carried out, which was isolated from adipose tissue. **Research Method:** Protein analysis using Ninhydrin test and Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). The results of the Ninhydrin test showed a color change from pink to purple, which means a positive result contains amino acids. **The Result:** The results of the test using the SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) method, the MSC-CM protein profile was observed based on its molecular weight. Proteins were detected at a size of 38 kDa – 98 kDa consisting of VEGF at 45 kDa, EGF containing fibulinlike at 55 kDa, ECM protein-1 at 61 kDa, and TGFβ at 75 kDa. **Conclusions:** Based on the protein identification test in MSC-CM, the results showed that there was a positive protein content which was predicted to be a growth factor secreted by MSC.

Keywords: *Mesenchymal Stem Cells, Protein, Conditioned Medium.*

ABSTRAK

Permasalahan: Sel punca mesenkimal / *mesenchymal stem cells* (MSC) merupakan sel yang paling banyak membentuk organ stroma sumsum tulang belakang. MSC memiliki kemampuan memperbarui diri sampai jumlah yang cukup untuk menyembuhkan luka. Media tempat tumbuh MSC yang belum berdiferensiasi disebut media terkondisi sel punca mesenkimal atau *mesenchymal stem cells-conditioned medium* (MSC-CM) dan mempunyai efek seperti MSC. **Tujuan Penelitian:** Pada penelitian ini dilakukan analisa kandungan protein yang terdapat dalam MSC-CM yang diisolasi dari jaringan adiposa. **Metode Penelitian:** Analisis protein menggunakan uji Ninhidrin dan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil Uji Ninhidrin menunjukkan terjadinya perubahan warna dari merah muda ke ungu yang berarti hasil positif terdapat asam amino. **Hasil:** Hasil uji dengan metoda SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), profil protein MSC-CM diamati berdasarkan berat molekulnya. Protein terdeteksi pada ukuran 38 kDa – 98 kDa yang terdiri dari VEGF pada 45 kDa, EGF containing fibulinlike pada 55 kDa, ECM protein-1 pada 61 kDa dan TGFβ pada 75 kDa. **Kesimpulan:** Berdasarkan uji identifikasi protein pada MSC-CM didapatkan hasil yang menunjukkan positif adanya kandungan protein yang diprediksi sebagai faktor pertumbuhan yang disekresikan oleh MSC.

Kata Kunci: Sel Punca Mesenkimal, Protein, Medium Terkondisi.

PENDAHULUAN

Sel punca adalah sel yang menjadi awal mula dari pertumbuhan sel lain yang menyusun keseluruhan tubuh organisme, termasuk manusia (Halim *et al.*, 2010). Sel punca merupakan sel khusus yang mempunyai potensi membelah diri dalam waktu yang tidak terbatas dan dapat menghasilkan berbagai jenis sel spesifik (Rifati *et al.*, 2012).

Sel punca mesenkimal / *mesenchymal stem cells* (MSC) memiliki nama lain sel stromal multipoten, dimana sel ini adalah sel yang paling banyak membentuk organ stroma sumsum tulang belakang (Halim *et al.*, 2010). Sel ini juga dapat diisolasi dari berbagai jaringan dewasa seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, *wharton jelly*, tendon dan membran ataupun cairan sinovial. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa MSC mengeluarkan faktor faktor seperti sitokin, faktor pertumbuhan, protein matriks ekstraseluler yang berperan dalam perbaikan jaringan dan zat imunomodulator yang dapat menekan inflamasi karena luka maupun karena penolakan oleh tubuh (Azarpira, 2015). MSC juga memiliki kemampuan memperbarui diri sampai jumlah yang cukup untuk menyembuhkan luka atau menggantikan jaringan yang rusak (Rifati *et al.*, 2012).

Media tempat tumbuh MSC yang belum berdiferensiasi disebut media terkondisi sel punca mesenkimal atau *mesenchymal stem cells-conditioned medium* (MSC-CM). MSC-CM mengandung berbagai metabolit bioaktif yang memiliki efek serupa dengan MSC (Wolbank *et al.*, 2010; ATCC, 2014). CM mengandung faktor pertumbuhan proangiogenik sitokin dan faktor pertumbuhan lainnya (Laqif, 2015). MSC-CM memiliki keunggulan seperti imunogenisitas rendah, berefek antiinflamasi, dan nontumorigenesis. Selain itu, media ini mudah untuk diproduksi secara masal, mudah disimpan pada suhu - 20°C sampai dengan -80°C, mudah digunakan, serta karena tidak mengandung sel punca sehingga meminimalkan resiko berkembangnya kanker dan meminimalkan masalah etika yang mungkin muncul jika digunakan sel punca (Toda *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2010). Tujuan penelitian ini untuk menganalisa kandungan protein yang terdapat dalam MSC-CM yang diisolasi dari jaringan adiposa.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan menggunakan metode eksperimen sesungguhnya (*True experimental laboratory*). Medium kultur menggunakan *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *fetal bovine serum* (FBS), dan antibiotik, dibuat aliquot dengan komposisi 20% FBS + 1% antibiotik penisilin-streptomisin dalam DMEM. Semua prosedur dilakukan dalam kondisi steril di bawah *biosafety cabinet*. Medium kultur/komplet ini dapat disimpan dalam lemari

pendingin (-20°C) apabila tidak digunakan dan dihangatkan dengan *waterbath* sampai suhu 37°C apabila ingin digunakan kembali.

Sel yang sudah jenuh (ditandai dengan *flask* yang 80 – 90% permukaannya telah ditumbuhi sel) yang memasuki fase hidup ke dua dibuang medium pertumbuhannya, lalu dicuci dengan PBS steril 2 kali, setelah itu dibuang PBS-nya. Proses tripsinasi dilakukan untuk melepaskan sel dari permukaan *flask* dengan cara menambahkan 1 ml tripsin-EDTA 0,5% ke dalam *flask*, lalu diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% suhu 37°C selama 5 menit, sehingga selnya dapat terlepas dari dasar *flask*. Lalu sel dicek dengan mikroskop *inverted* untuk memastikan bahwa sel sudah benar – benar terlepas. Medium kultur ditambahkan sebanyak 1 mL untuk menginaktivasi kerja tripsin, kemudian sel tersebut dimasukkan ke dalam *microtube*, lalu disentrifugasi 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, lalu pelletnya diresuspensi dengan 4 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan ke dalam *flask* T25.

Sel yang telah memasuki fase hidup ke empat yang sudah konfluens 80 – 90%, mediumnya diambil lalu disaring dengan filter $0,22\ \mu\text{m}$ untuk menghilangkan puing-puing sel yang tertinggal. Filtrat diambil dan disimpan pada suhu -20°C .

Untuk menguji kandungan protein dari CM yang digunakan pada penelitian ini, dilakukan dua langkah analisis protein secara kualitatif. Analisis protein menggunakan uji Ninhidrin dan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Sampel uji di masukkan dalam tabung reaksi, kemudian dilakukan penambahan basa NaOH 1M, lalu dengan pereaksi Ninhidrin 1 % dipanaskan, dan diamati perubahan yang terjadi. Profil protein dari medium terkondisi diamati dengan SDS-PAGE. Sampel yang berisi $15\ \mu\text{l}$ medium terkondisi dan $15\ \mu\text{l}$ RSB (*Reducing Sample Buffer*) dipanaskan dengan penangas air bersuhu 95°C selama 5 menit. Setelah didinginkan sampel dapat dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel menggunakan mikropipet sebanyak $10\ \mu\text{l}$ per sumur, begitu pula dengan protein standar. Gel kemudian dimasukkan ke dalam chamber yang diisi dengan larutan *Running Buffer*. Setelah itu anoda dan katoda dihubungkan dengan masing-masing reservoir sesuai dengan kutubnya. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 80 volt selama 60 menit atau hingga bromophenol mencapai 1 cm dari batas gel. Setelah itu gel diwarnai dengan 0.05% *Coomassive Blue R-250* dalam metanol 15% dan

asam asetat 5% kemudian diinkubasi selama 60 menit. Setelah itu dilakukan pelunturan gel dengan membilas gel menggunakan aquades terlebih dahulu, kemudian direndam dengan campuran metanol 30% dan asam asetat 10% diinkubasi hingga 12 jam hingga didapatkan pita protein berwarna biru dengan latar gel bening.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan Medium Terkondisi

Pada penelitian ini menggunakan sel punca yang telah terkarakterisasi MSC dari jaringan adiposa. Jaringan adiposa didapatkan dari pasien yang menjalankan operasi di RSUP DR. M. Djamil, Padang. Proses isolasi dan karakterisasi sel dilakukan oleh tim laboratorium INA-Lab, Padang. Semua prosedur yang dilakukan terhadap sel punca dilakukan sesuai dengan aturan yang berlaku.

Sel punca yang digunakan adalah sel yang telah memasuki fase hidup keempat, atau disebut *passage* 4 (P4). Sel P4 merupakan sel yang sudah di subkultur sebanyak tiga kali. Subkultur adalah proses mengembangbiakan sel dengan cara melepaskan sel dari sel yang telah konfluen (*flask* telah tertutupi oleh sel) 80 – 90 %, biasanya dengan menggunakan enzim proteolitik seperti tripsin, kemudian sel dibagi dan ditumbuhkan kembali pada medium yang baru, sehingga sel memasuki fase hidup yang selanjutnya (ATCC, 2014). Subkultur merupakan proses memperbanyak sel dan dapat membuat sel lebih homogen serta mempengaruhi kinetika pertumbuhan sel, sehingga dapat meningkatkan potensi sel untuk mengobati penyakit degeneratif (Ma'at, 2011; ATCC, 2014; Rizal *et al.*, 2019).

Medium pertumbuhan yang digunakan pada proses isolasi dan subkultur adalah *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). DMEM mengandung 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukosa, 1 mM sodium piruvat, dan 1500 mg/L sodium bikarbonat (Invitrogen, 2009). DMEM digunakan karena mengandung vitamin dan asam amino 4 kali lebih besar dan mengandung 2-4 kali lebih banyak glukosa dan terdapat tambahan unsur besi dan phenol red dibandingkan dengan medium pertumbuhan lainnya seperti *Minimum Essential Medium- Alpha* (MEM- α) dan *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) (Mather & Roberts, 1998; Ma'at, 2011).

Dalam penyiapan medium kultur, dibutuhkan zat tambahan lainnya seperti *Fetal Bovine Serum* (FBS), penisilin dan streptomisin. DMEM saja tidak cukup untuk memenuhi kebutuhan nutrisi sel selama masa kultur, sehingga ditambahkan FBS yang mengandung nutrisi, hormon dan faktor pertumbuhan untuk membantu proliferasi dan diferensiasi sel. FBS merupakan suplemen yang paling umum ditambahkan kedalam medium kultur. Konsentrasi FBS yang dipakai untuk mengkultur sel adalah 20% dari total medium. Penisilin dan streptomisin berfungsi sebagai antibakteri dan antijamur dengan konsentrasi 0,1% (Widowati *et al.*, 2015).

Sel yang sudah konfluen memasuki fase hidup ke tiga atau P3 dibuang medium pertumbuhannya, lalu dicuci dengan PBS steril sebanyak dua kali. Proses tripsinasi dilakukan untuk melepaskan sel dari permukaan *flask* dengan cara menambahkan 1 ml tripsin-EDTA 0,5% ke dalam *flask*, lalu diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C selama 5 menit, sehingga selnya dapat terlepas dari dasar *flask*. Lalu sel dicek dengan mikroskop *inverted* untuk memastikan bahwa sel sudah benar – benar terlepas. Medium kultur ditambahkan sebanyak 1 mL untuk menginaktivasi kerja tripsin, kemudian sel tersebut dimasukkan ke dalam *microtube*, lalu disentrifugasi 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, lalu pelletnya diresuspensi dengan 4 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan ke dalam *flask* T25 dan diinkubasi dalam inkubator dengan kadar CO₂ 5% suhu 37°C (Ma'at, 2011; Osugi *et al.*, 2012).

Setelah 2 hari, sel yang telah memasuki fase hidup ke empat atau P4 diamati menggunakan mikroskop *inverted*. Apabila sudah konfluen mediumnya diambil lalu disaring dengan filter 0,22 µm untuk menghilangkan puing-puing sel yang tertinggal. Filtrat diambil dan disimpan pada suhu -20°C (Gambar 1).

Gambar 1. Hasil filtrat medium kultur P4 MSC

Analisis Protein

MSC-CM mengandung faktor pertumbuhan seperti *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan kolagen (Fu *et al.*, 2007). Selain itu juga ditemukan komponen matriks ekstraseluler seperti kolagen tipe I, V, VI, XII, dan fibronectin dengan *secreted protein acidic rich in cysteine* (SPARC) dan *insulin-like growth factor binding protein-7* (IGFBP-7) (Walter *et al.*, 2010).

Pada uji ninhidrin menunjukkan terjadinya perubahan warna dari merah muda ke ungu (Gambar 2), yang secara teori hasil positif ninhidrin adalah berwarna biru, ungu dan kuning, bergantung dari jenis asam amino penyusunnya (Ata *et al.*, 2016). Pada uji ninhidrin warna ungu pada larutan disebabkan karena adanya reaksi yang terjadi antara α -amino acids dengan ninhidrin. Senyawa ninhidrin yang bersifat oksidasi tinggi menyebabkan terjadinya dekarboksilasi oksidatif terhadap α -amino acids, menghasilkan hidrindantin, CO_2 , NH_3 , dan aldehid. Bergabungnya senyawa NH_3 , hidrindantin dan ninhidrin tersebutlah yang memberikan warna biru/ungu pada larutan. Uji Ninhidrin bertujuan untuk membuktikan keberadaan asam amino bebas dalam zat yang diuji (Ata *et al.*, 2016; Tiwari, 2017; Lestari, Suardana & Sukrama, 2019).

Gambar 2. Kontrol negatif, CM dan CM yang sudah direaksikan dengan reagen ninhidrin, terjadi perubahan warna dari merah muda menjadi ungu

Uji selanjutnya adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Profil protein MSC-CM diamati berdasarkan berat molekulnya. Protein terdeteksi pada ukuran 38 kDa – 98 kDa yang terdiri dari VEGF pada 45 kDa (Stefanini *et*

al., 2008), EGF containing fibulinlike pada 55 kDa, ECM protein 1 pada 61 kDa dan TGF β pada 75 kDa (Simper *et al.*, 2010) (Gambar 3).

Gambar 3. Profil protein pada MSC-CM dimana 1 : protein standar/ *protein marker* dan 2 : MSC-CM

KESIMPULAN

Berdasarkan uji identifikasi protein pada MSC-CM dengan uji Ninhidrin dan uji SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) didapatkan hasil yang menunjukkan positif adanya kandungan protein yang diprediksi sebagai faktor pertumbuhan yang disekresikan oleh MSC.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Tim INA-Lab, Padang dan laboratorium Mikrobiologi, fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang.

DAFTAR PUSTAKA

Ata, S. T. W. *et al.* (2016) 'Isolasi Kolagen Dari Kulit Dan Tulang Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*)', *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Science*, 1(1), pp. 27–30.

- ATCC (2014) *Animal Cell Culture Guide*. Manassas.
- Azarpira, N. (2015) 'The Role of Mesenchymal Stem Cells in Diabetes Mellitus', *International Journal of Stem cell Research & Therapy*, 2(2), pp. 1–5. doi: 10.23937/2469-570x/1410010.
- Fu, X. *et al.* (2007) 'Adipose tissue extract enhances skin wound healing', *Wound Repair and Regeneration*, 15(4), pp. 540–548. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00262.x.
- Halim, D. *et al.* (2010) *Stem Cell: Dasar Teori & Aplikasi Klinis*. Erlangga.
- Invitrogen (2009) 'DMEM Dulbecco's Modified Eagle Media'.
- Laqif, A. (2015) *Kajian Terapi Media Terkondisi Sel Punca Mesensimal (MT-SPM) Selaput Amnion pada Kasus Kegagalan Ovarium Prematur (Penelitian pada Hewan Coba Tikus Sprague-Dawley)*. Universitas Gadjah Mada.
- Lestari, N. K. L., Suardana, I. W. and Sukrama, I. D. M. (2019) 'Karakteristik Fisikokimia dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteriosin dari Isolat Bakteri Asam Laktat 15B hasil Isolasi Kolon Sapi Bali', *Buletin Veteriner Udayana*, (21), p. 65. doi: 10.24843/bulvet.2019.v11.i01.p11.
- Ma'at, S. (2011) *Teknik Dasar Kultur Sel*. Yogyakarta: Airlangga University Press.
- Mather, J. P. and Roberts, P. E. (1998) *Introduction to Cell and Tissue Culture Theory and Technique*. Edited by J. P. Mather and P. E. Roberts. New York: Plenum Press.
- Osugi, M. *et al.* (2012) 'Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects', *Tissue Engineering - Part A*, 18(13–14), pp. 1479–1489. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0325.
- Rifati, L. *et al.* (2012) *Laporan Penelitian : Induksi In-Vitro Sel Punca Mesenkim dari Tali Pusat Manusia Menjadi Sel Punca Limbal*. Jakarta.
- Rizal, R. *et al.* (2019) 'Effect of Serial Passage on Growth Kinetics, Biological Properties, and Differentiation Into Adipocytes of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells', *Majalah Kedokteran Bandung*, 51(3), pp. 127–133. doi: 10.15395/mkb.v51n3.1767.
- Simper, D. *et al.* (2010) 'Comparative proteomics profiling reveals role of smooth muscle progenitors in extracellular matrix production', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(7), pp. 1325–1332. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.204651.
- Stefanini, M. O. *et al.* (2008) 'A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues', *BMC Systems Biology*, 2, pp. 1–25. doi: 10.1186/1752-0509-2-77.
- Tiwari, A. (2017) *Practical Biochemistry: A Student Companion*. Guwahati: Lambert Academy Publishing.
- Toda, A. *et al.* (2007) 'The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues', *Journal of Pharmacological Sciences*, 105(3), pp.

215–228. doi: 10.1254/jphs.CR0070034.

- Walter, M. N. M. *et al.* (2010) ‘Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays’, *Experimental Cell Research*, 316(7), pp. 1271–1281. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.026.
- Widowati, W. *et al.* (2015) ‘Conditioned medium from normoxia (WJMSCs-norCM) and hypoxia-treated WJMSCs (WJMSCs-hypoCM) in inhibiting cancer cell proliferation’, *Biomarkers and Genomic Medicine*, 7(1), pp. 8–17. doi: 10.1016/j.bgm.2014.08.008.
- Wolbank, S. *et al.* (2010) ‘Alternative sources of adult stem cells: Human amniotic membrane’, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 123, pp. 1–27. doi: 10.1007/10_2010_71.