



STEM CELL

MESENCHYMAL, HEMATOPOETIK,
DAN MODEL APLIKASI

Edisi Kedua

Oleh:

Fedik A. Rantam
Ferdiansyah
Purwati



Dr. SOETOMO

STEM CELL

MESENCHYMAL, HEMATOPOETIK,
DAN MODEL APLIKASI

Edisi Kedua

Oleh:

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
Dr. Ferdiansyah, dr., SpOT(K)
Dr. Purwati, dr., SpPD., FINASIM



Airlangga University Press



© 2014 Airlangga University Press

AUP 600/31.538/08.14 (1.570)

Dilarang mengutip dan atau memperbanyak tanpa izin tertulis dari
Penerbit sebagian atau seluruhnya
dalam bentuk apapun, baik cetak, fotoprint, mikrofilm dan sebagainya.

Edisi kedua

Cetakan pertama — 2014

Penerbit:

Airlangga University Press (AUP)

Kampus C UNAIR, Mulyorejo Surabaya 60115

Telp. (031) 5992246, 5992247 Fax. (031) 5992248

E-mail: aupsby@rad.net.id; aup.unair@gmail.com

Dicetak oleh:

Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair

(PNB 045/11.16/AUP-B5E)

Perpustakaan Nasional: Katalog Dalam Terbitan (KDT)

Stem Cell : *Mesenchymal*, hematopoetik, dan model
aplikasi edisi kedua / Ed. Fedik Abdul Rantam ... [et
al.]. -- Surabaya: Airlangga University Press (AUP),
2014.

xxviii, 280 hlm.; 15,8 x 23 cm.

Termasuk bibliografi

ISBN 978-602-7924-69-7

1. Stem Cell.

I. Judul.

616.02774

ANGGOTA IKAPI: 001/JTI/95

ANGGOTA APPTI: 001/KTA/APPTI/X/2012

KONTRIBUTOR PENULIS BUKU

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

Lab. Virologi dan Imunologi, Dep. Mikrobiologi, FKH., Lab. *Stem Cell, Institute of Tropical Disease (ITD).*, *Regenerative Medicine & Stem Cell Center* RSUD. Dr. Soetomo/FK Universitas Airlangga Surabaya.

Dr. Ferdiansyah, dr., SpOT(K)

Dep. Ortopedi, RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Regenerative Medicine Stem Cell Center*, Bank Jaringan, RSUD. Dr. Soetomo/FK – Universitas Airlangga Surabaya

Dr. Purwati, dr., SpPD, FINASM

Devisi Tropik Infeksi, Dep. Penyakit Dalam, RSUD Dr. Soetomo/FK, *Regenerative Medicine Stem Cell Center* RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Stem Cell, Institute of Tropical Disease (ITD)* – Universitas Airlangga Surabaya

Prof. Dr. Med. Puruhito, dr., SpJTKV(K)

Dep. Bedah Jantung Thorak dan Kardiovaskular, RSUD. Dr. Soetomo/FK Universitas Airlangga

Dr. Heri Suroto, dr., SpOT(K)

Dep. Ortopedi, RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Regenerative Medicine Stem Cell Center*, Bank Jaringan, RSUD. Dr. Soetomo/FK – Universitas Airlangga Surabaya

Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., SpOT(K)

Dep. Ortopedi, RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Regenerative Medicine Stem Cell Center*, Bank Jaringan, RSUD. Dr. Soetomo/FK – Universitas Airlangga Surabaya

Dr. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K)

Dep. Obstetrik dan Genikologi, RSUD. Dr. Soetomo/FK Universitas Airlangga

PRAKATA

vii

Syukur Alhamdulillah, setelah terselesaikan buku *stem cell* jilid pertama dengan judul "*exploration of human stem cell: Isolation and culture*" pada tahun 2009 yang dapat digunakan sebagai acuan dasar dalam pengembangan *stem cell* secara *in-vitro*, maka buku *Stem Cell* edisi ke dua yang memuat tentang biologi dan potensi *stem cell*, serta aplikasi *stem cell*. *Stem cell* merupakan *germ cell* atau sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi sel yang diinginkan sesuai dengan lingkungan mikro. Oleh karena itu berdasar pada sifat dan kemampuannya lebih dikenal dengan sel yang mempunyai fleksibilitas (*plasticity*) tinggi.

Aplikasi *stem cell* di bidang kedokteran regeneratif (*regenerative medicine*) saat ini berkembang dengan pesat karena sel tersebut dapat berfungsi untuk mengganti sel yang mati, integrasi dengan sel jaringan hospes, menghasilkan molekul efek autokrin dan parakrin, dapat dieksplorasi dari berbagai sumber, dapat dikembangkan secara *in-vitro*, dapat diaplikasikan secara *autogenous* maupun *allogeneous*. Saat ini banyak aplikasi *stem cell* dikembangkan di bidang *bioengineering* dalam bentuk komposisi (*composite*) rekayasa jaringan yang terdiri dari *scaffold*, *cell*, dan faktor pertumbuhan (*growth factors*).

Buku ini ditulis bertujuan untuk memberikan pengetahuan dan gambaran secara umum dan khusus tentang *stem cell* serta model aplikasinya secara mendasar dengan cara eksperimen pada hewan model penyakit. Edisi ini merupakan hasil kontribusi beberapa ilmuwan dari berbagai bidang disiplin ilmu a.l. Dr. Med. dr. Puruhito, Dr. drh. Fedik A. Rantam, Dr. dr. Ferdiansyah, Dr. dr. Joni Wayuhadi, Dr. dr. Heri Suroto, Dr. dr. Budi S. Pikir, Dr. dr. Hendy Hendarto, Dr. dr. Purwati, Dr. dr. Ninik Asmaningsih Soemyarso, Dr. dr. Cita R. Prakoeswo, Dr. dr. Dwikora N. Utomo yang memuat tentang biologi *stem cell*, kultur *stem cell*, *preparasi single cell*, *bone fracture repair*, *hemopoietic stem cell*, *neuron repair*, *tendon repair*, *heart repair*, *stem cell* untuk *repair* organ reproduksi, *aorta repair*, serta *stem cell follicle* rambut, dan *repair* jaringan tulang rawan (*cartilage*).

DAFTAR ISI

ix

Kontributor Penulis Buku	v
Prakata	vii
Daftar Gambar	xvii
Daftar Tabel	xxvii
Bab 1	
EKSPLORASI STEM CELL DAN PERTUMBUHAN SEL SECARA	
UMUM	1
Eksplorasi <i>Stem Cell</i>	1
Pertumbuhan Sel	3
Kultur Sel	4
Jumlah Sel (<i>Cell Quantification</i>)	4
Viabilitas Sel	5
Pengukuran Tidak Langsung (<i>Indirect Measurements</i>) Masa Produk Sel	6
Kinetik Pertumbuhan Sel	6
1. Medium dan Nutrien	8
2. pH	9
Lingkungan Mikro Kultur Sel	10
Pentingnya Serum dalam Kultur Sel	11
Faktor Pertumbuhan (<i>Growth Factors</i>)	11
Hormon	13
Faktor Perlekatan dan Penyebaran Sel	13
1. Substrat	13
2. Pengaruh Substrat pada Sel	14
Protein Pengikat	14
<i>Lipid</i>	14
Mineral	14
<i>Ficoll</i>	15
Kulture <i>Stem Cell</i> dari <i>Bone Marrow</i>	16
Persiapan Peralatan	16
Persiapan Bahan	17
Koleksi Sampel	17
Bahan	18
Isolasi Sel Mononukleat	18
Diferensiasi Sel dan Persiapan Aplikasi	19
Bibliografi	21

Isolasi RNA dari Mamalia	65
Isolasi Total RNA.....	65
Material	65
Isolasi RNA dari kultur Sel.....	66
Isolasi RNA dari Jaringan.....	66
Isolasi snRNA dan RNA di Sitoplasma	67
Material	67
Persiapan Sampel.....	68
Isolasi RNA Sitoplasma.....	68
Isolasi RNA.....	68
Isolasi RNA Glikoprotein dan Oligosakarida Jaringan.....	69
Prosedur Isolasi.....	69
Prinsip Dasar PCR.....	70
Proses Pelipatgandaan	70
Tahapan Denaturasi.....	71
Tahapan Annealing.....	71
Tahap Ekstensi.....	71
Skema Amplifikasi.....	71
Bahan Dasar.....	71
PCR-Mixture.....	72
Kondisi PCR.....	72
One Step PCR (untuk Praktikum Khusus CD4).....	72
Susunan Primer.....	73
Mendesain Primer.....	73
Optimasi Kondisi Primer	73
Penilaian Produk PCR.....	74
Protokol Ekstraksi dan PCR.....	74
Bibliografi	77

Bab 5

PROTOKOL ISOLASI DAN KULTUR STEM CELL

HEMATOPOETIK.....	79
Pendahuluan	79
Isolasi dan Kultur <i>Stem Cell</i> Hematopoetik dari <i>Bone Marrow Stem Cell</i>	79
Alat dan Bahan	80
Metode	81
Identifikasi Maturasi limfosit	83
a. Imunofluoresense indirek	84
b. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	85

Bab 8	
MESENCHYMAL STEM CELL (MSCs) DAN APLIKASINYA PADA REKAYASA JARINGAN TENDON	121
Pendahuluan	121
<i>Freeze dried Allograft Tendon</i> sebagai <i>Scaffold</i>	125
Komposit <i>Freeze dried Tendon Allograft</i> dan MSCs.....	127
Efikasi Penggunaan Komposit <i>Freeze Dried Tendon Allograft</i> dan MSCs dalam Rekonstruksi Defek Tendon Fleksor pada Hewan Coba.....	130
Bibliografi	134
Bab 9	
STEM CELL DAN REGENERASI OTAK	139
Pendahuluan	139
Neurogenesis.....	139
Aplikasi <i>Stem Cell</i> pada Neurogenesis.....	141
Pendekatan Eksogen.....	142
Pendekatan Endogen.....	142
Simpulan.....	143
Bibliografi	143
Bab 10	
TRANSPLANTASI STEM CELL SUMSUM TULANG UNTUK PERBAIKAN FOLIKULOGENESIS PADA MENCIT MODEL KEGAGALAN OVARIUM DENGAN PEMBERIAN KEMOTERAPI	145
Pendahuluan	145
Materi Dan Metode.....	146
Membuat Mencit Model Kegagalan Ovarium.....	147
Isolasi <i>Stem Cell</i> Sumsum Tulang	147
Transplantasi <i>Stem Cell</i> Sumsum Tulang (SPST).....	147
Hasil Penelitian dan Diskusi	148
Ekspresi SCF.....	148
Ekspresi GDF-9.....	150
Hitung Folikel Ovarium.....	152
Daftar Pustaka.....	153

Bab 14	
POTENSI REGULASI HOMEOSTASIS SEL PUNCA FOLIKEL RAMBUT PADA APLIKASI KLINIS DI BIDANG DERMATOLOGI.....	193
Pendahuluan.....	193
Sel Punca Folikel Rambut dan Siklus Pertumbuhan Rambut.....	194
Niche Sel Punca Folikel Rambut.....	198
Regulasi Intra dan Ekstra Folikel pada Sel Punca Folikel Rambut.....	200
Potensi Sel Punca Folikel Rambut pada Aplikasi Klinis.....	201
Penyembuhan Luka.....	202
Neogenesis pada <i>Androgenetic Alopecia</i>	203
Daftar Pustaka.....	205
Bab 15	
ALLOTRANSPLANTASI MESENCHYMAL STEM CELL (MSCs) PADA FIBROSIS GINJAL	209
Pendahuluan	209
Fibrosis Ginjal.....	210
Fase 1: Aktivasi Seluler dan Jejas	210
Fase 2: Signal Fibrogenik.....	211
Fase 3: Fase Fibrogenik	212
Fase 4: Destruksi.....	213
Peran <i>Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1)</i> pada Fibrosis Ginjal.....	213
<i>Allotransplantasi MSCs Menghambat Transforming Growth Factor Beta 1</i> pada Fibrosis Ginjal.....	215
Simpulan.....	218
Daftar Pustaka.....	218
Bab 16	
REKAYASA TULANG RAWAN SENDI (CARTILAGE TISSUE ENGINEERING)	223
Pendahuluan.....	223
Teknik Rekayasa Jaringan (<i>Cartilage Engineering</i>)	225
<i>Bone Marrow MSCs - Scaffold Freeze Dried Bovine Cartilage Powder - Platelet Rich Plasma Composit (SMPC)</i>	227
Kesimpulan	230
Bibliografi	230

REKAYASA TULANG RAWAN SENDI (*CARTILAGE TISSUE ENGINEERING*)

Dwikora Novembri Utomo^{1,3}, Ferdiansyah^{1,3}, Fedik A. Rantam^{2,3,4}

¹ Departemen Orthopedi dan Traumatologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Rumah Sakit Umum Daerah Dr Soetomo, Surabaya, Indonesia

² Laboratorium Stem Cell, Institute of Tropical Disease (ITD), Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

³ Regenerative Medicine & Stem Cell Centre, Universitas Airlangga & Rumah Sakit Umum Daerah Dr Soetomo, Surabaya, Indonesia

⁴ Lab. Virologi dan Imunologi, Dep. Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya.



PENDAHULUAN

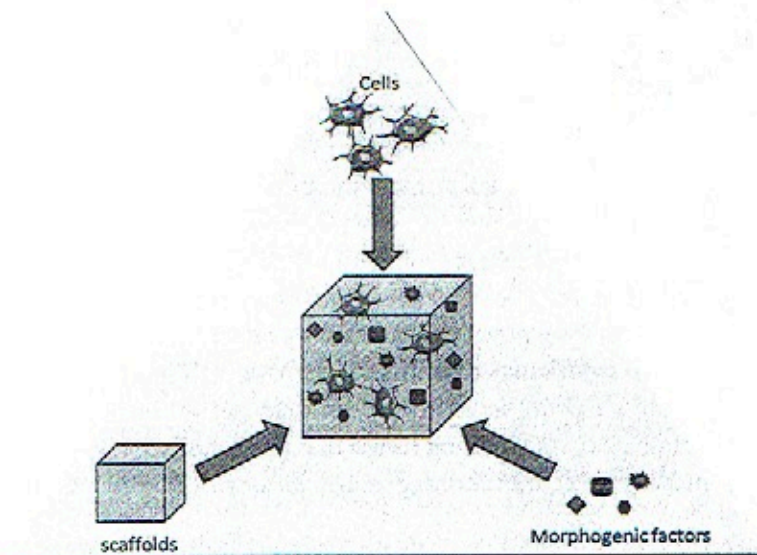
Kerusakan tulang rawan sendi (*cartilage*) merupakan masalah yang berat karena apabila terjadi kerusakan pada tulang rawan sendi maka tidak akan pernah mengalami kesembuhan. Ini terjadi karena kemampuan *regenerasi* tulang rawan yang terbatas dan buruk (Athanasiou *et al.*, 2002). Regenerasi pada tulang rawan sendi yang buruk terjadi karena sifatnya yang avaskuler, minimal sel, tanpa membran basal dan tanpa inervasi dari syaraf sehingga nutrisinya hanya tergantung dari proses difusi. Kerusakan *cartilage* yang menembus subkondral (*fullthickness cartilage defect*) meskipun terbentuk *clot formation* karena adanya aliran darah, tetapi tanpa suatu intervensi akan menghasilkan regenerasi berupa *fibrocartilage* yang lemah secara biomekanika dan akan mengalami kerusakan setelah beberapa waktu (William, 2006; Drakos and Allen, 2007).

Berdasarkan studi pada lebih dari 31.000 kasus artroskopi lutut (endoskopi lutut) pada semua kelompok umur didapatkan kerusakan osteokondral (*full thickness cartilage defect*) sebesar 63% (Curl, 2007). Pada penelitian lain ditemukan kerusakan kondral sebesar 60% dari 25.124 kasus artroskopi sendi lutut (Hijelle, 2007), sedangkan studi lain juga mendapatkan kerusakan tulang rawan sendi 61% dari 1000 prosedur artroskopi lutut, 11% diantaranya merupakan *full thickness cartilage defect* (Shah *et al.*, 2007).

Teknik rekayasa jaringan (*cartilage engineering*) menggunakan kombinasi antara sel (*chondrocytes* atau *mesenchymal stem cells*), *scaffold* (natural atau sintesis) dan *growth factor*. *Mesenchymal stem cells* (MSCs) memberikan harapan baru dalam menanggulangi *cartilage defect* pada sendi karena MSCs dapat berdiferensiasi menjadi kondrosit serta mempengaruhi pembentukan matrik ekstraseluler (Chen *et al.*, 2007).

Kombinasi dari ketiga komponen sel, *scaffold* dan *growth factor* seperti yang diilustrasikan Gambar 1 memiliki potensi yang besar dalam terapi kerusakan *articular cartilage*. Sel dapat berproliferasi menjadi kondrosit dan menghasilkan matriks ekstraselular yang diperlukan (Ringe *et al.*, 2002).

Scaffold mampu menjadi fondasi bagi sel untuk ditanam di tempat defek dan menyediakan stabilitas mekanis untuk pertumbuhan jaringan baru dan integrasinya dengan jaringan sekitar (Cancedda *et al.*, 2003). *Growth factor* bisa mengarahkan pertumbuhan sel sehingga bisa berproliferasi menjadi sel yang diinginkan. Sel (stem sel dengan potensi *chondrogenic* atau *chondrocyte*), faktor morfogenik dan *scaffold* (natural atau sintetik) kemudian dikombinasikan secara *in vitro* untuk membentuk rekayasa jaringan *scaffold* yang sesuai untuk implantasi (Wozney, 2002).



Gambar 16.1 Representasi skematis dari komponen yang diperlukan untuk teknik rekayasa jaringan. (Vinatier, 2009)

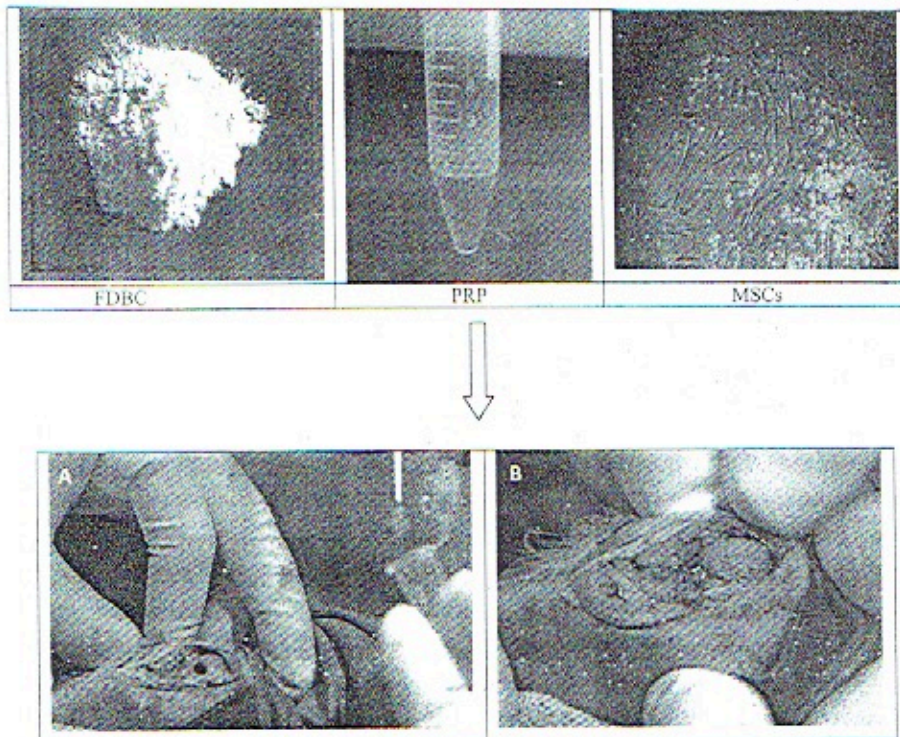
memperbaharui diri. *Scaffold* memiliki kemampuan biokompatibilitas dan biodegradasi atas penyembuhan jaringan. Struktur yang berpori memungkinkan sel (MSCs) untuk melakukan penetrasi terhadap jaringan sehingga cukup *permeable* untuk pengiriman nutrisi dan pertukaran gas. Selain itu struktur tersebut adaptif terhadap perubahan mekanis di sekitar. *Scaffold* juga memiliki permukaan yang kondusif untuk tempat melekat dan migrasi sel sehingga memungkinkan pembentukan ekstraseluler matriks beserta transmisi molekul untuk sinyal komunikasi antarsel (Noth, 2008).

Dikenal dua jenis *scaffold* yaitu natural (*alginate, agarose, chitosan, fibrin glue, hyaluronan, collagen*) dan sintetis (*Polylactic acid* dan *Polyglycolic acid*). *Alginate, agarose* serta *chitosan* tidak banyak digunakan karena pengalaman klinis yang sangat sedikit, sedangkan *scaffold* sintetis penggunaannya terbatas terutama diakibatkan oleh reaksi imunologi. *Hyaluronan* dan kolagen sangat populer digunakan sebagai *scaffold* karena kedua jenis *natural scaffold* tersebut ditemukan pada struktur normal *cartilage* (Junji, 2008).

BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL (BM-MSCs) – SCAFFOLD FREEZE DRIED BOVINE CARTILAGE POWDER – PLATELET RICH PLASMA COMPOSIT (SMPC)

Aplikasi rekayasa jaringan dilakukan untuk meregenerasi *fullthickness cartilage defect* dengan menggunakan MSCs yang disatukan dengan berbagai jenis *scaffold* tersebut. Di RS Dr Soetomo dikembangkan *scaffold* yang dibuat dari tulang rawan sendi sapi dalam bentuk *powder* dengan proses pengeringan-pembekuan (*freeze dried*) yang disebut sebagai *Freeze Dried Bovine Cartilage Powder (FDBC)*. *Scaffold* ini dikombinasikan dengan *platelet rich plasma (PRP)* yang banyak mengandung faktor pertumbuhan (*growth factor*). Selanjutnya kombinasi bahan implan tersebut pada penelitian ini dikenal dengan *scaffold FDBC-Mesenchymal Stem Cells-Platelet Rich Plasma Composite (SMPC)*, yang akan diimplantasikan pada *full thickness cartilage defect*.

Platelet rich plasma (PRP) melarutkan FDBC yang bersifat hidrofilik dan akan menyatu dengan MSCs membentuk campuran berbentuk gel. Pembuatan PRP sendiri terdiri atas dua tahap untuk mendapatkan konsentrasi *platelet* yang paling tinggi, didapatkan sentrifugasi optimal untuk mendapatkan peningkatan jumlah *platelet* 500% adalah 3000 rpm selama 13 menit pada tahap 1 dan 15 menit dengan putaran 3000 rpm pada tahap 2. Konsentrasi *platelet* yang tinggi dianalogikan dengan jumlah *growth factor* yang terkandung di dalam *platelet* tersebut (Rofii dan Dwikora, 2011).



Gambar 16.3 Proses implantasi SMPC pada defek *cartilage* kelinci. A. Sebelum implantasi B. Sesudah implantasi.

Pada penelitian *full thickness cartilage defect* diterapi tiga perlakuan, yaitu *scaffold*, BM-MSCs dan SMPC didapatkan hasil bahwa jumlah kondrosit, jumlah kolagen tipe 2 dan luas *cartilage* yang terbentuk pada kelompok SMPC lebih tinggi dibandingkan *scaffold* dan BM-MSCs. Ini karena pada kelompok SMPC *growth factors* yang berasal dari *scaffold* dan PRP akan memberikan kontribusi lebih besar daripada hanya dari BM-MSCs dan *scaffold* saja. Peranan lain berasal dari jumlah BM-MSCs yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok SCF. *Cartilage formation* juga akan lebih luas terbentuk pada kelompok SMPC, karena BM-MSCs yang sudah berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel kondroprogenitor kemudian menjadi *chondrocyte* akan mendapat stimulasi (*signaling*) untuk memproduksi matriks ekstraselular baik dari *scaffold*, yaitu CDMP1/GDF5 dan dari daerah *defect* yaitu BMP2, IGF1, BMP7, TGF β . *Chondrocytes* yang terbentuk bersama sama dengan ekstraselular matriks akan membentuk *cartilage* (*cartilage formation*) yang lebih luas dari kelompok BM-MSCs dan kelompok *scaffold* (Dwikora, 2013).



- Gikas PD, Aston WJ and Briggs TW, 2008. Autologous chondrocyte implantation: where do we stand now? *J Orthop Sci*, 13: 283-92.
- Gobbi A and Bathan L, 2009. Biological Approach for Cartilage Repair. *J Knee Surg*, 2: 36-44.
- Handayani RD, 2008. Faktor resiko yang mempengaruhi terjadinya osteoarthritis pada lansia di Instalasi Rehabilitasi Medik RSU Haji Surabaya tahun 2008, Fakultas Kesehatan Masyarakat.
- Junji, 2009. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surgeon Sports Traumatology Arthroscopy*, 17: 561-577.
- Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T and Sekiya K, 2009. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. 17: 1289-97.
- Rofi'i dan Dwikora NU, 2011. Optimal Concentration Platelet rich plasma and growth factor with various centrifugation technique. *Thesis*, Universitas Airlangga.
- Reddi AH, 2003. Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis*, 62: 73-78.
- Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y and Takaoka K, 2008. Present status and future direction for cartilage repair, 26: 115-22.
- Williams III Riley J, Feeley Brian T and Bedi Askeesh, 2010. Management of Articular Cartilage Defect of the Knee. *J Bone Joint Surg Am*, 92: 994-1009.
- Yusbida A dan Dwikora NU, 2012. Pengaruh sitotoksik freeze dried bovine scaffold dan platelet rich plasma terhadap mesenchymal stem cells pada cartilage tissue-engineering. *Tesis*, Universitas Airlangga.



STEM CELL

MESENCHYMAL, HEMATOPOETIK,
DAN MODEL APLIKASI

Edisi Kedua

Oleh:

Fedik A. Rantam
Ferdiansyah
Purwati





STEM CELL

MESENCHYMAL, HEMATOPOETIK,
DAN MODEL APLIKASI

Edisi Kedua

Oleh:

Fedik A. Rantam
Ferdiansyah
Purwati

