

## **Pengaruh Prototipe Enkapsulasi Berbasis Alginat Terhadap Viabilitas dan Stabilitas Sel Punca Mesenkim**

**Rilianawati, Subintoro, Elrade Rofaani**

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

Email: rilianawati@bppt.go.id

### **Abstract**

*Research in the field of stem cells is currently growing very quickly. Hospitals in Indonesia have used stem cells as an alternative to cure some diseases such as diabetes, heart disease, fractures and joints, dental implants, and others. In Indonesia alone there are 11 hospitals that have been using treatment with stem cells such as RSCM and RS. Soetomo as a pain rmah Pembina. Today, adult stem cells can be obtained not only from the spinal cord and peripheral vessels, but also from human body fatty tissue, which can be isolated as adherent stem cells (mesenchymal stem cells). The consideration of fatty tissue as a source of mesenchymal stem cells (MSCs) for autologous tissue engineering is that they are available in abundant quantities through minimally invasive procedures, as well as are easily cultured and reproduced. It is possible to breed and differentiate in the desired direction of the tissue. However, stem cell growth requires special conditions to grow such as requiring optimum growth conditions such as ambient temperature of 37 ° C and a concentration of 5% CO<sub>2</sub>. Maintenance MSC also requires a subculture process, that is the process of moving MSC from full culture media to new media, continuous subculture process can cause changes in MSC. The survival of stem cells may be disrupted by micro-conditions such as hypoxia, oxidative stress. Cell encapsulation is a method of cell capture in semipermeable polymer membranes, generally biocompatible encapsulation materials such as chitosan, hyaluronic acid, and alginate. The ability of alginate to form 3D structure and low toxicity characteristic and high biocompatibility make alginate widely used for encapsulation process. Encapsulation is generally done to protect cells. Therefore, the purpose of this study was to determine whether alginate-based encapsulation can improve stability viability and stability by using different concentrations of alginate and CaCl<sub>2</sub>.*

**Keyword: Mesenchymal Stem Cell, adipose tissue, encapsulation, alginate**

### **Abstrak**

Penelitian di bidang sel punca saat ini berkembang dengan sangat cepat. Rumah sakit di Indonesia telah menggunakan sel punca sebagai alternatif untuk menyembuhkan beberapa penyakit seperti diabetes, penyakit jantung, patah tulang dan persendian, implan gigi, dan lain-lain. Di Indonesia sendiri ada 11 rumah sakit yang sudah menggunakan pengobatan dengan sel punca diantaranya RSCM dan RS Dr. Soetomo sebagai rmah sakit Pembina. Saat ini, sel induk dewasa dapat diperoleh tidak hanya dari sumsum tulang belakang dan pembuluh perifer, tetapi juga dari jaringan lemak tubuh manusia, dimana bisa diisolasi sebagai sel punca adherent (sel punca mesenkim). Pertimbangan jaringan lemak sebagai sumber sel punca mesenchymal (SPM) untuk rekayasa jaringan autologous adalah karena mereka tersedia dalam jumlah berlimpah melalui prosedur invasif minimal, serta mudah dikultur dan diperbanyak. Hal ini dimungkinkan untuk berkembang biak dan berdiferensiasi ke arah yang diinginkan dari jaringan. Namun, pertumbuhan sel induk memerlukan kondisi khusus untuk tumbuh seperti membutuhkan kondisi pertumbuhan optimum seperti suhu lingkungan 37 ° C dan konsentrasi 5% CO<sub>2</sub>. Pemeliharaan SPM juga memerlukan proses subkultur, yaitu proses memindahkan SPM dari media kultur penuh ke media baru, proses subkultur berkelanjutan dapat menyebabkan perubahan pada SPM. Kelangsungan hidup sel punca mungkin terganggu oleh kondisi mikro seperti hipoksia, stres oksidatif. Enkapsulasi sel adalah metode penangkapan sel dalam membran semipermeabel polimer, umumnya bahan enkapsulasi biokompatibel seperti kitosan, asam hyaluronik, dan alginat. Kemampuan alginat untuk membentuk struktur 3D dan karakteristik toksisitasnya yang rendah dan biokompatibilitas tinggi membuat alginat banyak digunakan untuk proses enkapsulasi. Enkapsulasi umumnya dilakukan untuk melindungi sel. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah enkapsulasi berbasis alginat dapat meningkatkan viabilitas dan stabilitas sel punca dengan menggunakan beberapa konsentrasi alginat dan CaCl<sub>2</sub> yang berbeda-beda.

**Kata kunci : Sel punca mesenkim, jaringan lemak, enkapsulasi, alginat**

## Pendahuluan

Sel Punca Mesenchymal (SPM) adalah objek prospektif untuk penggunaan dalam terapi sel dan dipelajari secara intensif oleh banyak kelompok penelitian. SPM ditandai terutama oleh ekspresi penanda permukaan dan potensial diferensiasi. SPM mengekspresikan serangkaian penanda spesifik (CD44, CD90, CD105, CD13, dll.) dan harus berdiferensiasi menjadi sel asal mesodermal seperti adiposit, osteoblas dan chondrocytes (Witkowska-Zimny dan Walenko 2011; (Chen PM et al., 2011). Karena lokasi anatomis yang mudah diakses dan keberadaan jaringan adiposa subkutan yang banyak yang menjadi pertimbangan jaringan lemak sebagai sumber sel punca mesenchymal untuk rekayasa jaringan autologous adalah karena jaringan adiposa tersedia dalam jumlah berlimpah melalui prosedur invasif minimal, serta mudah dikultur dan diperbanyak. Hal ini dimungkinkan untuk berkembang biak dan berdiferensiasi ke arah yang diinginkan dari jaringan. Namun, pertumbuhan sel punca memerlukan kondisi khusus untuk tumbuh seperti membutuhkan kondisi pertumbuhan optimum seperti suhu lingkungan 37°C dan konsentrasi 5% CO<sub>2</sub>. Pemeliharaan SPM juga memerlukan proses subkultur, yaitu proses memindahkan SPM dari media kultur penuh ke media baru, proses subkultur berkelanjutan dapat menyebabkan perubahan pada SPM. Kelangsungan hidup sel punca mungkin terganggu oleh kondisi mikro seperti hipoksia, stres oksidatif.

Alginat adalah senyawa polimer anionik yang dapat diperoleh dari alga coklat dan mikroba *Pseudomonas* dan *Azotobacter*. Alginat mencakup sekelompok eksopolisakarida non-bercabang dan tidak berulang yang terdiri dari dua monomer yaitu asam  $\beta$ -D-mannuronat dan asam  $\alpha$ -L-guluronat (Lee dan Mooney, 2012). Alginat akan berinteraksi dengan kation divalen, seperti Ca<sup>2+</sup>, dan membentuk struktur 3D.

Kemampuan alginat untuk membentuk struktur 3D dan karakteristik toksisitasnya yang rendah dan biokompatibilitas tinggi membuat alginat banyak digunakan untuk proses enkapsulasi (Yang dan Wright, 1999).

Enkapsulasi sel adalah metode penangkapan sel dalam membran semipermeabel polimer, umumnya bahan enkapsulasi biokompatibel seperti kitosan, asam hyaluronic, dan alginat. Enkapsulasi umumnya dilakukan untuk melindungi sel. Enkapsulasi sel punca embrionik dengan alginat dilaporkan dapat mempertahankan viabilitas sel induk selama 110 hari tanpa mengalami diferensiasi dan tanpa memerlukan pemeliharaan subkultur (Siti-Ismail, 2008). Enkapsulasi MSCs dengan alginat-CaCl<sub>2</sub> diketahui menjaga viabilitas dalam kondisi hipotermia (<37°C) dan tanpa konsentrasi gas spesifik (Swioklo et al., 2016). Enkapsulasi juga dapat melindungi sel punca dari kekuatan gesekan, lingkungan mikro, dan respon kekebalan (Duscher et al., 2016). Metode enkapsulasi sel melibatkan 2 tahap utama: dispersi larutan yang mengandung sel menjadi kecil dan diikuti oleh pembentukan gelasi atau membran pada permukaan larutan terdispersi, misalnya metode ekstrusi tetesan. Larutan alginat akan diekstrusi melalui nosel atau jarum sehingga menghasilkan tetesan dengan ukuran tertentu. Pengaturan ukuran tetesan dapat dilakukan dengan menyesuaikan kecepatan ekstrusi dan ukuran nosel (Yang dan Wright, 1999). Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah enkapsulasi berbasis alginat dapat meningkatkan viabilitas dan stabilitas sel punca mesenchymal dengan menggunakan beberapa konsentrasi alginat dan CaCl<sub>2</sub> dengan lama enkapsulasi selama 28 hari.

## **Metode**

### **Kultur Sel Punca Mesenkim (SPM)**

SPM dikulturkan pada media  $\alpha$ -MEM yang diberi penambahan Platelet Rich Plasma (PRP), Pensilin/Streptomisin, dan Heparin. Penggantian media tumbuh dilakukan setiap 3 hari. Subkultur SPM dilakukan saat SPM sudah konfluen  $\pm$  80%. (Chen, et al. 2009)

### **Optimasi Enkapsulasi MSC**

#### **A. Optimasi Konsentrasi Alginat dan CaCl<sub>2</sub>.**

Larutan alginat (Sigma Aldrich) dipreparasi pada konsentrasi berdasarkan hasil optimasi konsentrasi alginat(w/v). Sel punca mesenkimal  $1 \times 10^6$  dicampur dalam 1 ml larutan alginat. Larutan kemudian dijatuhkan dalam bentuk tetesan dengan metode ekstrusi menggunakan jarum suntik 31 G pada larutan CaCl<sub>2</sub> dengan waktu kontak  $\pm$ 30 menit. Mikrokapsul yang terbentuk kemudian dicuci menggunakan NaCl 0.9% dan disimpan dalam media kultur. Konsentrasi CaCl<sub>2</sub> yang akan dipergunakan pada tahapan selanjutnya dipilih berdasarkan hasil uji viabilitas dan uji stabilitas MSC terenkapsulasi pada hari ke-0, 1, 7, 14, 21, 28. (Penolazzi, et al. 2010)

#### **B. Analisa Enkapsulasi Sel Punca**

##### **Dekapsulasi Mikrokapsul Berbasis Alginat**

Mikrokapsul diamati morfologi melalui mikroskop setiap hari sampai hari ke-28. Pada hari ke-1, 7, 14, 21, dan 28 dilakukan uji viabilitas serta stabilitas sel punca mesenkim dalam mikrokapsul. Mikrokapsul didekapsulasi menggunakan larutan EDTA 500 mM + 10 mM HEPES dalam PBS. Dekapsulasi dilakukan selama 15 menit dalam waterbath shaker dengan

suhu 37°C. Campuran larutan kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 1200 rpm dan didapatkan pelet sel yang kemudian didilusi dengan media tumbuh 2 ml. (Bussche, et al. 2015)

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) :

Viabilitas sel punca mesenkim dilakukan untuk melihat apakah selama proses enkapsulasi dan penyimpanan sel dapat tetap hidup dan berproliferasi. Metode yang digunakan untuk mengukur viabilitas sel punca ini adalah menggunakan metode MTT. Transfer sel hasil dekapsulasi kedalam sumuran sebanyak 100 $\mu$ L. Ditambahkan reagen MTT (0,5 mg/mL) sebanyak 100 $\mu$ L kemudian inkubasi dalam inkubator 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 4 jam. Setelah itu tambahkan 10% SDS ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Absorbansi diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

#### **C. Analisa Live Dead Assay (LDA)**

Pengujian dengan menggunakan Propidium Iodium (PI) sebagai penanda sel yang mati dan Calcein sebagai penanda sel yang hidup, dengan konsentrasi PI = 10  $\mu$ M dan Calcein 2  $\mu$ M.

#### **D. Analisa Stabilitas**

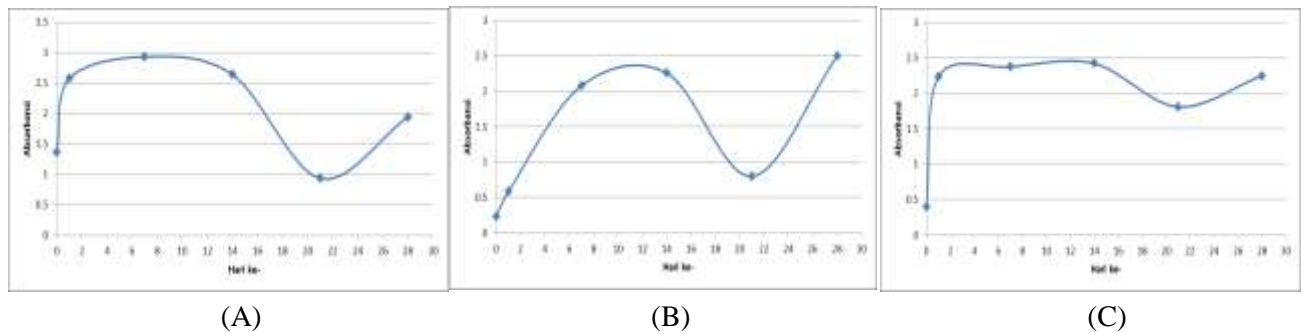
Uji stabilitas sel dilakukan untuk melihat apakah selama penyimpanan terjadi diferensiasi sel punca mesenkim. Pengujian diferensiasi sel adiposit diuji/distaining dengan menggunakan pewarnaan Oil red-O, sedangkan pengujian diferensiasi kondrosit dan osteoblast masing-masing diuji menggunakan pewarnaan alcian blue dan alizarin red.

## Hasil

### 1. Hasil Pengujian MTT :

**Tabel 1. Absorbansi uji MTT pada SPM Hasil Dekapsulasi Mikrokapsul Alginat dengan CaCl<sub>2</sub>**



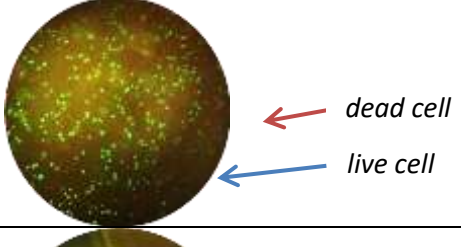
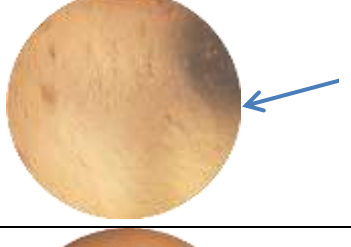






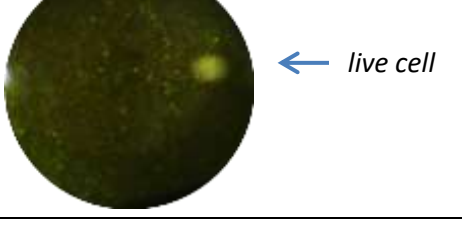
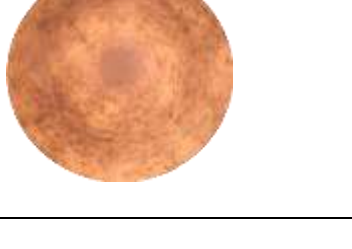
Hari ke-	Nilai Absorbansi Uji MTT		
	Formula 1	Formula 2	Formula 3
0	1.362	0.23	0.39
1	2.575	0.586	2.233
7	2.931	2.076	2.369
14	2.642	2.253	2.417
21	0.937	0.797	1.805
28	1.941	2.491	2.243





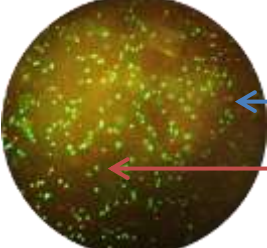

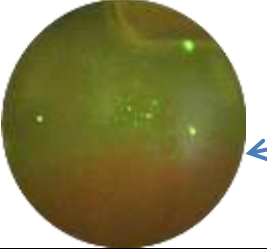

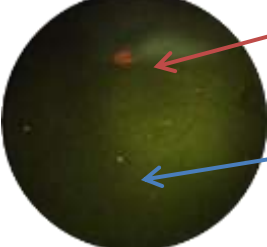



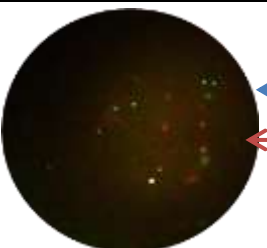

**Grafik.1. Hasil Uji MTT pada SPM Hasil Dekapsulasi Mikrokapsul Alginat dengan: (A) Formula 1; (B) Formula 2; (C) Formula 3**

2. Hasil Pengujian Live-Dead (LDA)



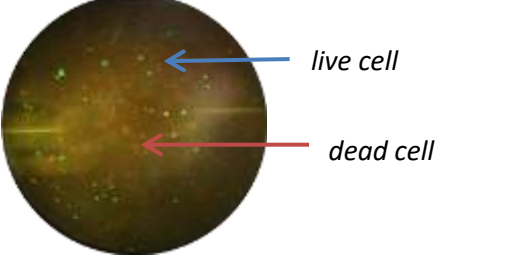



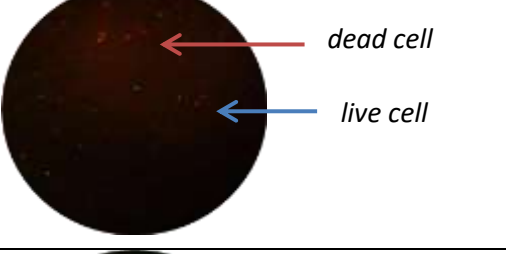



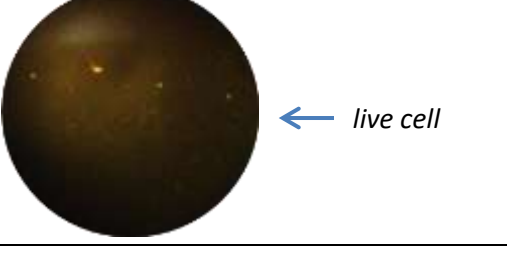

**Tabel.2. Hasil Pengamatan (mikroskop) mikrokapsul SPM berbasis alginate formula 1 yang hidup dan mati setelah di dekapsulasi dengan waktu enkapsulasi yang berbeda dengan suhu penyimpanan 37°C (inkubator) :**

Hari ke-	Suhu 37°C	
	Live-dead cell Assay	Mikrokapsul
0		
1		
7		
14		
21		
28		

**Tabel.3. Hasil Pengamatan (mikroskop) mikrokapsul SPM berbasis alginate formula 2 yang hidup dan mati setelah di dekapsulasi dengan waktu enkapsulasi yang berbeda dengan suhu penyimpanan 37°C (inkubator) :**


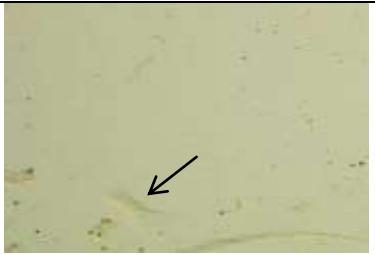













Hari ke-	Suhu 37°C	
	Live-dead cell Assay	Mikrokapsul
0	 <p>live cell dead cell</p>	 <p>sel</p>
1	 <p>live cell dead cell</p>	 <p>sel</p>
7	 <p>live cell</p>	
14	 <p>dead cell live cell</p>	 <p>sel</p>
21	 <p>live cell dead cell</p>	
28	 <p>live cell dead cell</p>	 <p>sel</p>

**Tabel.4. Hasil Pengamatan (mikroskop) mikrokapsul SPM berbasis alginate formula 3 yang hidup dan mati setelah di dekapsulasi dengan waktu enkapsulasi yang berbeda dengan suhu penyimpanan 37°C (inkubator) :**








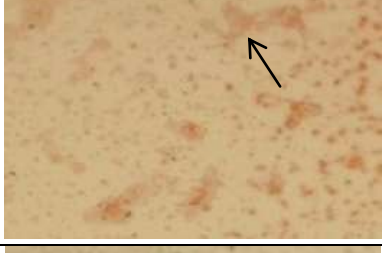




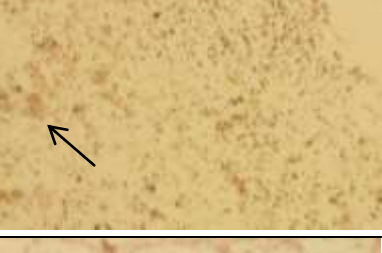

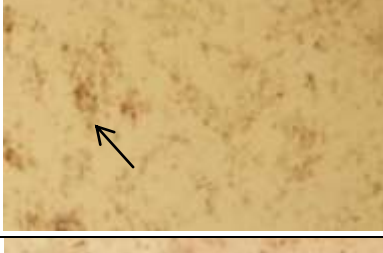

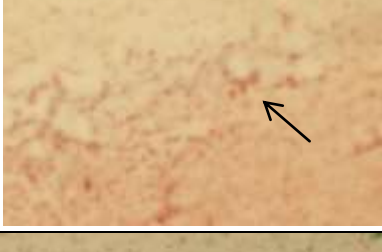




Hari ke-	Suhu 37°C	
	Live-dead cell Assay	Mikrokapsul
0		
1		
7		
14		
21		
28		



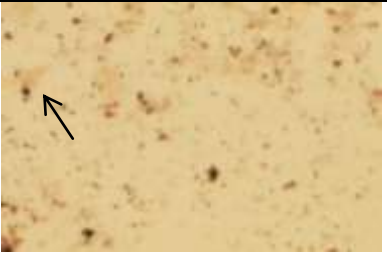
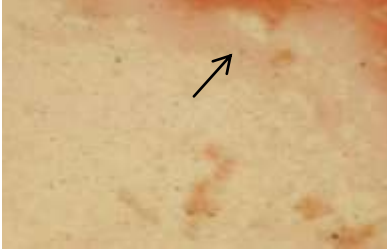



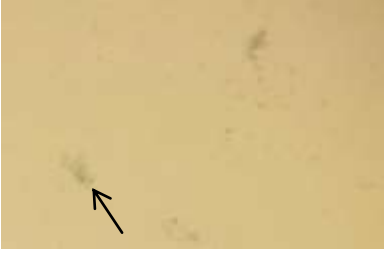








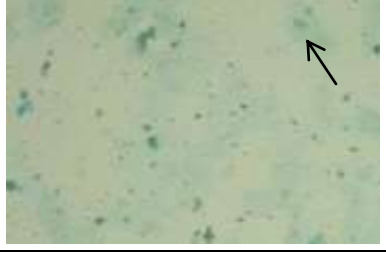

### 3. Hasil Analisa Stabilitas

**Tabel.5. Hasil Pengamatan (mikroskop) uji stabilitas mikrokapsul SPM berbasis alginate setelah di dekapsulasi dengan waktu enkapsulasi yang berbeda dengan suhu penyimpanan 37°C (inkubator) :**

Hari ke-	Pewarna			
		Formula 1	Formula 2	Formula 3
0	Oil Red O			
	Alizarin Red			
	Alcian Blue			
1	Oil Red O			
	Alizarin Red			



	Alcian Blue			
7	Oil Red O			
	Alizarin Red			
	Alcian Blue			
14	Oil Red O			
	Alizarin Red			
	Alcian Blue			

21	Oil Red O			
	Alizarin Red			
	Alcian Blue			
28	Oil Red O			
	Alizarin Red			
	Alcian Blue			

Keterangan :  $\longrightarrow$  Sel punca yang tidak terdiferensiasi

## Pembahasan

Dari hasil grafik.1. yang didapatkan menunjukkan bahwa pada mikrokapsul formula 1, mikrokapsul formula 2 dan mikrokapsul formula 3, nilai absorbansi dari hari ke-0, hari ke-1, hari ke-7, dan hari ke-14 menunjukkan peningkatan nilai absorbansi dimana dapat diasumsikan bahwa ada peningkatan jumlah sel dikarenakan senyawa MTT mengikat/mewarnai bagian mitokondria sel yang hidup. Sedangkan pada hari ke-21 terjadi penurunan pertumbuhan sel yang significant pada mikrokapsul formula 1 dan pada formula 2. Sedangkan untuk mikrokapsul formula 3 penurunan nilai absorbansi/jumlah sel tidak significant. Pada mikrokapsul formula 3, pertumbuhan SPM terlihat lebih stabil dibandingkan dari mikrokapsul formula 1 dan mikrokapsul formula 2. Hal ini mungkin dapat disebabkan karena pada mikrokapsul formula 3 memiliki konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan mikrokapsul formula 1 dan mikrokapsul formula 2. Sehingga memungkinkan medium tumbuh lebih mudah masuk ke dalam mikrokapsul pada formula 3 dibandingkan dengan formula 1 dan formula 2.

Hasil uji live-dead menunjukkan bahwa pada mikrokapsul formula 1, formula 2 dan formula 3, jumlah sel yang hidup (ditandai dengan warna hijau) terlihat mengalami penurunan jumlah sel sejalan dengan semakin lamanya waktu inkubasi penyimpanan. Semakin lama inkubasi penyimpanan terlihat semakin sedikit sel yang hidup. Hal ini mungkin dapat disebabkan karena media dan tempat tumbuh dalam mikrokapsul alginate semakin kecil sehingga kemungkinan tidak

ada tempat lagi untuk SPM untuk tumbuh dengan baik. Namun dalam waktu inkubasi selama 28 hari, SPM dalam mikrokapsul alginate masih dapat tumbuh dengan baik. Dari hasil uji stabilitas menunjukkan bahwa SPM setelah di enkapsulasi mulai hari ke-0 sampai dengan hari ke-28 tidak menunjukkan adanya morfologi diferensiasi ke sel adiposa, sel khondrosit dan sel osteoblast. Hal ini mendukung hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa enkapsulasi sel punca embrionik dengan alginat dilaporkan dapat mempertahankan viabilitas punca selama 110 hari tanpa mengalami diferensiasi dan tanpa memerlukan pemeliharaan subkultur (Siti-Ismail, 2008).

## Kesimpulan

Dari hasil didapatkan menunjukkan bahwa SPM dalam mikrokapsul alginate dapat tumbuh dengan baik sehingga dapat digunakan sebagai tempat tumbuh SPM tanpa memerlukan pemeliharaan subkultur.

## Saran

Dari hasil uraian diatas disarankan agar dapat dilakukan penelitian enkapsulasi lebih lama (lebih dari 28 hari) untuk penelitian selanjutnya untuk melihat viabilitas dan stabilitas Sel Punca Mesenkim berbasis alginate.

## Daftar Rujukan

1. Siti-Ismail, N. Bishop, A.E. Polak, J.M. Mantalaris A. The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance. *Biomaterials*, Vol. 29, hal. 3946-62.

2. Swioklo, S., Constantinescu A., Connon C.J. Alginate-encapsulation for the improved hypothermic preservation of human adipose-derived stem cells. *Stem Cell Translational Medicine* 2016; Vol. 5, hal. 339-49.
3. Witkowska-Zimny M. & Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2011; Vol. 16, hal. 236-257.
4. Yang, H. & Wright R. Calcium Alginate, pp. 79-89. Dalam Kuhlreiber W.M., Lanza R.P., Chick W.L. (Ed.). *Cell Encapsulation Technology and Therapeutics*. Springer Science+ Business Media, LLC. New York.
5. Lee K.Y. & Mooney D.J. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2012; Vol. 37, hal. 106-126.
6. Duscher D., Barrera J., Wong V.W., Maan Z.N., Whittam A.J., Januszyk M., Gurtner G.C. Stem cells in wound healing: the future of regenerative medicine? A mini review. *Gerontology* 2016; Vol. 62, hal. 216-225.
7. Chen P.M., Yen M.L., Liu K.J., Sytwu H.K., Yen B.L. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2011; Vol. 18, No. 49, hal. 1-11.
8. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Six Edition. Cancer Research UK Centre for Oncology and Applied Pharmacology, Division of Cancer Sciences and Molecular Pharmacology, University of Glasgow. Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Inc., Publication. 2010
9. Chen H.H., V. Decot, J.P. Ouyang, J.F. Stoltz, D. Bensoussan, N.G. de Isla. In Vitro Initial Expansion of Mesenchymal Stem Cells is Influenced by The Culture Parameters Used in The Isolation Process. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2009; 19: 301--309
10. Bussche, L. , R.M Harman, B.A Syracuse, E.L Plante, Y.C Lu, T.M. Curtis, M. et al. Microencapsulated equine mesenchymal stromal cells promote cutaneous wound healing in vitro. *Stem Cell Research & Therapy* 2015; 6(66): 15 hlm.
11. Penolazzi, L., E. Tavanti, R. Vecchiatini, E. Lambertini, F. Vesce, R. Gambari, et al. Encapsulation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in alginate microbeads. *Tissue Engineering* 2010; 16(1): 141--155 hlm.