

## **Karakterisasi dan Diferensiasi Sel Punca Mesenkimal Asal Jaringan Adiposa Cokelat Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*)**

(*CHARACTERIZATION AND DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL  
STEM CELLS ORIGINATED FROM BROWN ADIPOSE TISSUE  
OF LONG TAIL MACAQUE (MACACA FASCICULARIS)*)

**Kartika Sari<sup>1</sup>, Silmi Mariya<sup>2</sup>, Irma H Suparto<sup>1,2,3</sup>,  
Fitriya Nur Annisa Dewi<sup>2</sup>, Permanawati<sup>2</sup>,  
Huda S Darusman<sup>2,4</sup>, Dondin Sajuthi<sup>1,2,5\*</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Primatologi,  
Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

<sup>2</sup>Pusat Studi Satwa Primata,  
Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, IPB  
Jl. Lodaya II No. 5, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16151.

<sup>3</sup>Departemen Kimia,  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB  
Jl. Meranti Kampus IPB Dramaga, Bogor,  
Jawa Barat, Indonesia 16680.

<sup>4</sup>Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi,

<sup>5</sup>Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, IPB  
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor,  
Jawa Barat, Indonesia 16680.

Email: [sajuthi@indo.net.id](mailto:sajuthi@indo.net.id)

### **ABSTRACT**

Mesenchymal stem cells (MSCs) from adipose tissue, known as multipotent stem cells, is a promising source of stem cells due to its abundance and it can be easily harvested, one of these cells is brown adipose tissue-derived cells which have gained new interest the field of degenerative disease. The aim of this study was to establish MSCs culture from brown adipose tissue (BAT) of *Macaca fascicularis*, particularly to characterize and evaluate their differentiation ability. MSCs were isolated from BAT obtained from biopsy of three adult male *M. fascicularis* on scapular area. MSCs were cultured and Polymerase Chain Reaction technique was used to confirm expression of markers for MSCs. The cells were further differentiated using growth media specific for osteocytes, chondrocytes and adipocytes. The results showed that BAT-derived MSCs had fibroblast-like morphology with spindle shape. Markers for MSCs (CD73, CD90, and CD105) were expressed. Importantly, the cells were able to differentiate into osteocytes, adipocytes and chondrocytes. These results showed that BAT of *M. fascicularis* can be a source for MSCs; these cells may be used further as in vitro model in the studies of regenerative medicine.

Keywords: Adipose; brown adipose tissue; nonhuman primate; mesenchymal stem cells

### **ABSTRAK**

Sel punca mesenkimal (SPM) asal jaringan adiposa dikenal sebagai sel punca multipoten yang menjanjikan karena kelimpahannya dan dapat dipanen dengan mudah, salah satunya berasal dari jaringan adiposa cokelat yang banyak dipelajari terkait penyakit degeneratif. Tujuan dari

penelitian ini adalah untuk membentuk kultur SPM dari jaringan adiposa cokelat (JAC) monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*), khususnya untuk mengkarakterisasi dan mengevaluasi kemampuan diferensiasinya. Sel punca mesenkimal diisolasi dari JAC yang diperoleh dari biopsi tiga ekor *M. fascicularis* jantan usia dewasa di daerah skapula. Sel punca mesenkimal dikultur dan digunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* untuk mengonfirmasi ekspresi penanda SPM. Sel-sel selanjutnya ditumbuhkan dengan media pertumbuhan khusus untuk osteosit, kondrosit dan adiposit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa SPM turunan JAC *M. fascicularis* memiliki morfologi *fibroblast-like* dengan bentuk *spindle*. Penanda untuk SPM (CD73, CD90, dan CD105) diekspresikan dan sel-sel ini mampu berdiferensiasi menjadi osteosit, adiposit dan kondrosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa JAC dari *M. fascicularis* dapat menjadi sumber untuk SPM yang dapat digunakan lebih lanjut sebagai model *in vitro* dalam penelitian dan pengembangan aplikasi kedokteran regeneratif.

Kata-kata kunci: adiposa; jaringan adiposa cokelat; satwa primata; sel punca mesenkimal

## PENDAHULUAN

Ilmu kedokteran regeneratif (*regenerative medicine*) yang memanfaatkan teknologi aplikasi sel punca berkembang sangat cepat dalam beberapa dekade terakhir ini di Indonesia dan juga secara umum di berbagai negara di dunia (Utomo, 2012). Penelitian di bidang sel punca mendapatkan minat yang tinggi karena pengobatan regeneratif dipandang memiliki potensi untuk menyembuhkan atau mengganti jaringan dan organ yang rusak akibat degenerasi, cacat bawaan, cedera jaringan, gangguan autoimun dan penyakit degeneratif neurogenik (Mao dan Mooney, 2015; Williams *et al.*, 2018). Teknologi yang memanfaatkan sel punca terus ditelusuri potensi dan aplikasinya sebagai metode pengobatan yang strategis pada penyakit degeneratif.

Kebutuhan sumber sel punca terus berkembang seiring dengan hasil-hasil penelitian yang menunjukkan potensi sel punca sebagai terapi alternatif. Sel punca mesenkimal (SPM) merupakan salah satu jenis sel punca yang paling banyak dipelajari karena memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri (*self-renewal*) dan berdiferensiasi menjadi sel lain dengan fungsi yang lebih spesifik (Ullah *et al.*, 2015). Sel punca mesenkimal (SPM) berbeda dengan sel punca embrionik karena kemampuan diferensiasinya lebih spesifik (multipoten) menjadi beberapa jenis sel yaitu osteosit, kondrosit, adiposit, dan dalam kondisi kultur tertentu SPM dapat berdiferensiasi menjadi garis keturunan nonmesodermal seperti hepatosit, neuron, sel pankreas, sel otot jantung, atau astrosit (Dominici *et al.*, 2006; Berebichez-Fridman *et al.*, 2017). Sel punca mesenkimal (SPM) dapat diisolasi dari berbagai jaringan tubuh seperti pulpa gigi, darah tali pusat, *Wharton's jelly*, cairan ketuban, plasenta,

darah tepi, *synovium* dan cairan *synovial*, endometrium, kulit, otot, dan jaringan adiposa (Berebichez-Fridman dan Montero-Olvera, 2018). Sel punca mesenkimal yang berasal dari sumsum tulang saat ini merupakan sumber sel punca yang paling banyak digunakan dan diteliti (Ayatollahi *et al.*, 2012; Baghaei *et al.*, 2017). Namun, isolasi sel punca yang berasal dari sumsum tulang memiliki keterbatasan karena menimbulkan rasa nyeri saat prosedur aspirasi sumsum tulang, dan menghasilkan jumlah SPM yang relatif sedikit (Mohamed-Ahmed *et al.*, 2018). Jaringan adiposa merupakan salah satu sumber alternatif dengan jumlah SPM yang melimpah dan mudah diisolasi serta memiliki distribusi tinggi di dalam tubuh. Isolasi sel punca adiposa memiliki tingkat morbiditas yang minimal karena koleksi jaringan relatif tidak invasif sehingga metode pemulihan pasien secara klinis lebih mudah (Harsan *et al.*, 2015).

Terdapat dua jenis jaringan adiposa dalam tubuh manusia yang pada dasarnya memiliki fungsi antagonis, yaitu jaringan adiposa putih dan jaringan adiposa cokelat (JAC). Berbeda dengan sel adiposa putih yang menyimpan energi berlebih sebagai trigliserida, sel adiposa cokelat berfungsi mempertahankan suhu tubuh dan konsumsi energi melalui termogenesis dengan aktivasi *uncoupling protein one* (UCP1) (Silva *et al.*, 2014). Sel adiposa cokelat juga memiliki kapasitas unik untuk mengeluarkan kalori dengan memisahkan pengeluaran energi dari produksi *adenosine triphosphate/ATP* (Yang *et al.*, 2017). Jaringan adiposa cokelat biasanya ditemukan dalam jumlah besar pada bayi baru lahir, dan jaringan ini berfungsi untuk mekanisme termoregulasi yang membuat bayi tersebut tanpa menggigil (Zhang dan Bi, 2015). Seiring bertambahnya usia, jumlah JAC menurun dan cenderung berubah menjadi bentuk depo yang terlokalisasi.

Jaringan adipose cokelat aktif pada manusia dewasa, ditemukan sebagai depo-depo yang berada di serviks, supraklavikula, mediastinal, paravertebral, dan daerah suprarenal (Silva *et al.*, 2014).

Selama beberapa dekade terakhir, JAC menjadi sorotan untuk dipelajari pada manusia dewasa terutama dalam kaitannya dengan obesitas dan penyakit metabolik. Jaringan adipose cokelat banyak diteliti sebagai metode terapi untuk diabetes mellitus dan obesitas dengan menghilangkan energi untuk memproduksi panas (Alaca *et al.*, 2019). Jaringan adipose cokelat mulai menjadi perhatian sebagai sumber sel punca pada beberapa tahun terakhir (Silva *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017). Studi menunjukkan bahwa SPM yang diisolasi dari JAC mediastinal manusia memiliki sifat seperti mampu memperbaharui diri dan mampu berdiferensiasi menjadi osteogenik, kondrogenik, serta adipogenik (Silva *et al.*, 2014). Sel punca mesenkimal turunan adiposa cokelat juga diduga lebih berpotensi sebagai metode terapi tambahan untuk pengobatan obesitas dan komplikasinya dibandingkan dengan SPM turunan adiposa putih (Gunawardana dan Piston, 2012; Stanford *et al.*, 2012).

Satwa primata khususnya monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) banyak digunakan sebagai hewan model dalam penelitian berbagai penyakit degeneratif dan metabolik karena memiliki potensi hasil studi yang translasional untuk diaplikasikan pada manusia. Sel punca mesenkimal satwa primata juga diketahui memiliki gambaran morfologi dan karakteristik sel yang sama dengan SPM pada manusia (Izadpanah *et al.*, 2005) sehingga satwa primata memiliki nilai kepentingan yang tinggi pada studi-studi kedokteran regeneratif. Keberhasilan isolasi SPM dari sumsum tulang dan tali pusat *Macaca fascicularis* telah dilaporkan dalam beberapa studi (Harsoyo *et al.*, 2018; He *et al.*, 2017; Ren *et al.* 2010), namun studi mengenai isolasi SPM *M. fascicularis* dari JAC belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kultur SPM yang diisolasi dan ditumbuhkan dari JAC *M. fascicularis* dewasa dan kemampuan diferensiasinya.

## METODE PENELITIAN

### Koleksi Jaringan Adiposa Cokelat

Sampel JAC diperoleh dari tiga ekor *M. fascicularis* dewasa jantan berumur 6-8 tahun

dengan bobot badan 5-7 kg. Seluruh prosedur yang dilakukan pada hewan penelitian telah disetujui Komisi Pengawasan Kesejahteraan dan Penggunaan Hewan Penelitian, Pengujian, Pendidikan dan Penangkaran (KPKPHP4) Pusat Studi Satwa Primata Institut Pertanian Bogor (PSSP-IPB) dengan nomor persetujuan IPB PRC-19-B008.

Koleksi JAC dilakukan melalui prosedur biopsi pada hewan yang dianestesi menggunakan kombinasi ketamin 15 mg/kg bb dan xylazine 0,5 mg/kg bb. Biopsi dilakukan pada bagian skapularis (punggung atas) dan jaringan adiposa yang diambil adalah jaringan adiposa subkutan. Perawatan hewan pascaoperasi dilakukan dengan pemberian analgetik dan antiinflamasi (tramadol 1 mg/kg bb, ketoprofen 2 mg/kg bb,) serta antibiotik (amoksilin 11 mg/kg bb).

### Isolasi Sel Berinti Tunggal dan Kultur Sel Asal Jaringan Adiposa

Sampel jaringan adiposa yang diperoleh melalui metode biopsi dicuci menggunakan PBS, selanjutnya ditambahkan kolagenase 0,75% dengan volume yang sama dengan PBS, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Suspensi jaringan dan enzim diresuspensi hingga jaringan hancur dan didapatkan sel berinti tunggal. Dulbecco's *Modified Eagle Medium* (DMEM) yang mengandung 20% FBS ditambahkan dan disentrifugasi pada 528,3 xg selama 15 menit untuk mendapatkan pelet sel. Pelet sel tersebut dicuci menggunakan PBS dan disentrifugasi selama 10 menit. Pelet yang terkumpul kemudian diresuspensi dalam media dan dilakukan perhitungan sel menggunakan hemositometer. Populasi sel dikultur pada pelat kultur enam sumur dalam inkubator dengan suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> dalam media seleksi penumbuh sel punca mesenkimal. Subkultur dilakukan ketika sel mencapai konfluensi 80-90%.

### Prosedur Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Ekstraksi mRNA dilakukan pada kultur sel punca mesenkimal menggunakan kit RNeasy (Qiagen, USA), dan konsentrasinya diukur menggunakan spektrofotometer Nanodrop (Thermo, USA) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Sampel mRNA ditranskripsi balik menggunakan iScript cDNA *Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories, USA). Prosedur ekstraksi mRNA dan *reverse transcriptase* PCR mengacu pada prosedur baku dari perusahaan.

Amplifikasi PCR dilakukan untuk mendeteksi populasi sel punca mesenkimal yang terdiri atas gen penanda SPM, gen penanda sel punca hematopoetik sebagai penanda negatif SPM, dan gen kontrol *Glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH). Gen penanda SPM terdiri atas gen pengkode CD73 yaitu *5'-nucleotidaseecto (NT5E)*, gen pengkode CD90 yaitu *Thy-1 cell surface antigen (THY1)*, dan gen pengkode CD105 yaitu *Endoglin (ENG)*, sedangkan gen penanda negatif SPM terdiri dari CD34 *molecule (CD34)* dan gen pengkode CD45 yaitu *protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC)*. Pereaksi PCR menggunakan goTaq PCR mix (Promega, USA) terdiri dari MgCl 25 mM, dATP 400 µM, dTTP 400 µM, dCTP 400 µM, dGTP 400 µM, air bebas nuklease, primer (*forward* dan *reverse*) ditambahkan 2 µl sampel cDNA.

Tahapan amplifikasi PCR terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50°C sesuai dengan *temperature melting* (Tm) masing masing primer (Tabel 1) yang digunakan selama 30 detik dan *elongasi* pada suhu 72°C selama 30 detik, yang diulang sebanyak 40 siklus. Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 2% dalam larutan penyangga tris asetat EDTA (TAE) 1x yang mengandung etidium bromida. Elektroforesis dijalankan pada tegangan listrik 100 volt, selama 45 menit. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan menggunakan alat dokumentasi gel doc.

### Diferensiasi Osteogenik, Kondrogenik dan Adipogenik

Sel punca mesenkimal dengan konsentrasi 3000/cm<sup>2</sup> ditumbuhkan pada tiga jenis media diferensiasi. Media diferensiasi osteogenik (Lonza, Singapore). Media diferensiasi kondrogenik terdiri atas DMEM (Gibco, USA) disuplementasi FBS 1%, insulin (Sigma, USA) 6,25 ug/mL, asam askorbat (Sigma USA) 50 ng/mL dan Transforming Growth Factor-Betha 1 (TGF-β1) (Sigma USA) 10 ng/mL. Media diferensiasi adipogenik terdiri atas Mesencult<sup>TM</sup> MSC *Basal Medium* (Human) (Gibco, USA), Mesencult<sup>TM</sup> 10x *Adipogenic Differentiation Supplement* (Human) (SCT, Singapore) 10%, Mesencult<sup>TM</sup> 500x *Adipogenic Differentiation Supplement* (Human) (SCT, Singapore) 0,2% , 200 mM L-Glutamin 1% (Gibco,USA).

Sel ditumbuhkan dalam masing-masing media diferensiasi selama 21 hari dan media diganti setiap tiga hari, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dengan konsentrasi CO<sub>2</sub> 5%. Prosedur pewarnaan dilakukan pada hari ke 21 menggunakan *Alizarin red* (ScienCell, USA) pada populasi sel hasil diferensiasi menjadi osteosit, *Alcian blue* (ScienCell, USA) pada populasi sel hasil diferensiasi menjadi kondrosit, atau *Oil red O* (ScienCell, USA) pada populasi sel hasil diferensiasi menjadi adiposit.

Sel osteosit, kondrosit, dan adiposit yang telah diwarnai kemudian diamati di bawah mikroskop. Hasil pewarnaan yang diperoleh

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk uji deteksi penanda sel punca mesenkimal

Gen Penanda	Runutan Nukleotida (5'-3')		Tm (°C)	Referensi
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>		
<i>5'-nucleotidaseecto (NT5E)/CD73</i>	GACCTGGCTTTGT GACAGCAA	CTGACCCTGAG TAAT CATGTCAGTCT	50	Mariya <i>et al.</i> , 2017
<i>Thy-1 cell surface antigen (THY1)/CD90</i>	CAGCTCACCCATC CAGTACGA	GTTGGTTCGGG AGCGGTAT	50	
<i>Endoglin (ENG)/CD105</i>	GACTGTCTTCAC GCGCTTGA	GGAAGGCACCA AAGGTGATG	50	
<i>Glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>	CGGATTTGGTCGT ATTGG	TCAAAGGTGGA GGAGTGG	50	Tian <i>et al.</i> , 2010
<i>CD34 molecule (CD34)</i>	GCACCCTGTGTC TCAACATGG	GCACAGCTGGA GTCTTATTTTGC	58	Kaufman <i>et al.</i> , 2014
<i>Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC)/CD45</i>	CATTTGGCTTTGC CTTTCTG	TTCTCTTTCAAA GGTGCTTGC	60	Cope, 2014

kemudian dianalisis dengan teknik *scoring* yang mengacu pada DeRycke *et al.* (2009) yakni tidak ada pewarnaan (-), <10% sel terwarnai (+), 10%-50% sel terwarnai (++), dan >50% sel terwarnai (+++). Skor didapat dari hasil rerata pengamatan sembilan lapang pandang pada mikroskop. Hasil skor yang didapat dievaluasi secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Jaringan Adiposa Cokelat Asal *Macaca fascicularis*

Sampel JAC dikoleksi dari tiga ekor *M. fascicularis* dewasa melalui biopsi jaringan adipose subkutis di area skapularis. Penentuan area koleksi ini sejalan dengan penelitian yang dilaporkan Kates *et al.* (1990) yang mengidentifikasi JAC pada area interskapular dan subskapular *M. fascicularis* jantan dan betina. Jaringan adiposa cokelat hasil biopsi disajikan pada Gambar 1. Secara morfologis, JAC berbeda dari jaringan adiposa putih, karena JAC memiliki warna yang lebih gelap sebagai akibat terdapat banyak pembuluh darah yang menyelimuti jaringan ini. Selain itu JAC memiliki tekstur yang padat, hal ini terjadi karena adiposit cokelat mengandung mitokondria yang berkembang baik mengisi sebagian besar sitoplasma. Kerapatan tinggi mitokondria sebanding dengan kardiomiosit. Sebaliknya, kandungan mitokondria jaringan adiposit putih rendah (Lee *et al.*, 2013).

### Kultur Sel Punca Mesenkimal

Kultur SPM asal jaringan adiposa cokelat berhasil ditumbuhkan, populasi sel ini masih heterogen ketika pertama kali ditumbuhkan dan menunjukkan populasi homogen setelah mengalami subkultur. Harsan *et al.* (2015) menyatakan pelet yang dihasilkan dari metode isolasi dikenal sebagai *stromal vascular fraction* (SVF) yang mengandung sel darah, fibroblast, *pericytes*, sel endotel dan preadiposit (progenitor adiposit). Sel ditumbuhkan pada media seleksi SPM agar hanya SPM yang dapat tumbuh pada medium tersebut. Tahap awal ditumbuhkannya suatu sel disebut kultur sel primer. Sel yang ditumbuhkan dapat disubkultur pada setiap periode satu sampai dua minggu saat konfluensi mencapai 80%. Sel disubkultur dan ditumbuhkan sampai sel tersebut *finite*. Sekelompok SPM yang dikultur memiliki waktu *finite* rata-rata pada pasase kelima. Sel dikatakan *finite* apabila tidak dapat bertambah

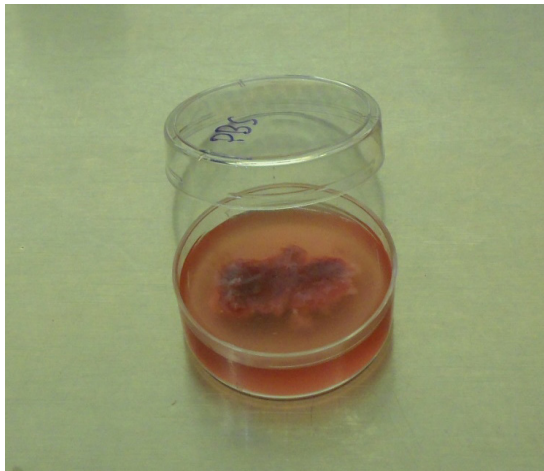
lagi populasinya dan sel mulai menunjukkan kematian yang dicirikan dengan terlepasnya beberapa populasi sel dari pelat kultur plastik. *Finite* pada sel merupakan suatu peristiwa yang tidak tertransformasi dan mengalami pemendekan telomer karena tidak aktifnya enzim telomerase sehingga mengakibatkan apoptosis yang dapat memengaruhi penurunan jumlah sel (Guadamillas, 2011).

Populasi sel yang berhasil dikultur memiliki morfologi *fibroblast-like* berbentuk *spindle* membentuk sel *monolayer* dengan sel menempel pada pelat kultur plastik sebagai substrat tempat tumbuhnya (Gambar 2). Selama kultur hingga *finite*, sel mempertahankan morfologi *fibroblast-like*. Salah satu ciri SPM yang dikultur sesuai dengan kriteria SPM yang didefinisikan *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (ISCT), yaitu pada kondisi kultur normal, memiliki kapasitas untuk dapat melekat pada dasar wadah kultur plastik. Kriteria lainnya yang didefinisikan ISCT (Dominici *et al.*, 2006) adalah sel harus mengekspresikan penanda SPM, tidak mengekspresikan penanda negatif SPM dan memiliki kemampuan diferensiasi *multilineage* secara *in vitro*.

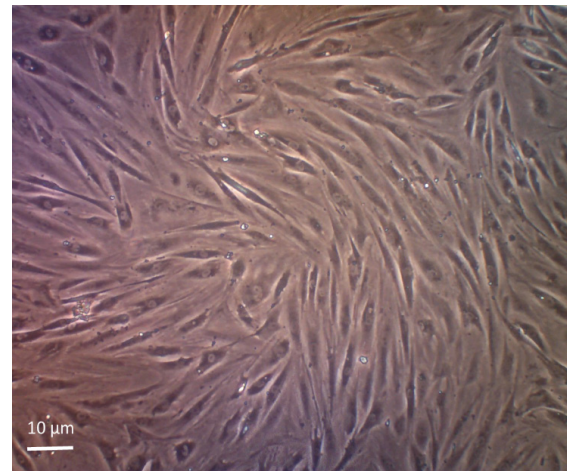
Penanda SPM yang terdiri dari CD73, CD90, dan CD105 diekspresikan SPM asal JAC *M. fascicularis*, sedangkan CD34 dan CD45 yang merupakan penanda negatif SPM tidak diekspresikan. *Clusters of Differentiation* (CD) merupakan penanda pada permukaan sel yang berguna untuk karakterisasi fenotip sel (Actor, 2019). Diekspresikannya tiga gen penanda SPM dan tidak terdapat ekspresi gen penanda sel punca hematopoetik mengonfirmasi bahwa sel yang dihasilkan merupakan populasi SPM (Dominici *et al.*, 2006). Hasil PCR kultur SPM asal JAC ditunjukkan dengan visualisasi pita DNA pada gel hasil elektroforesis (Gambar 3).

### Diferensiasi Sel Punca Mesenkimal

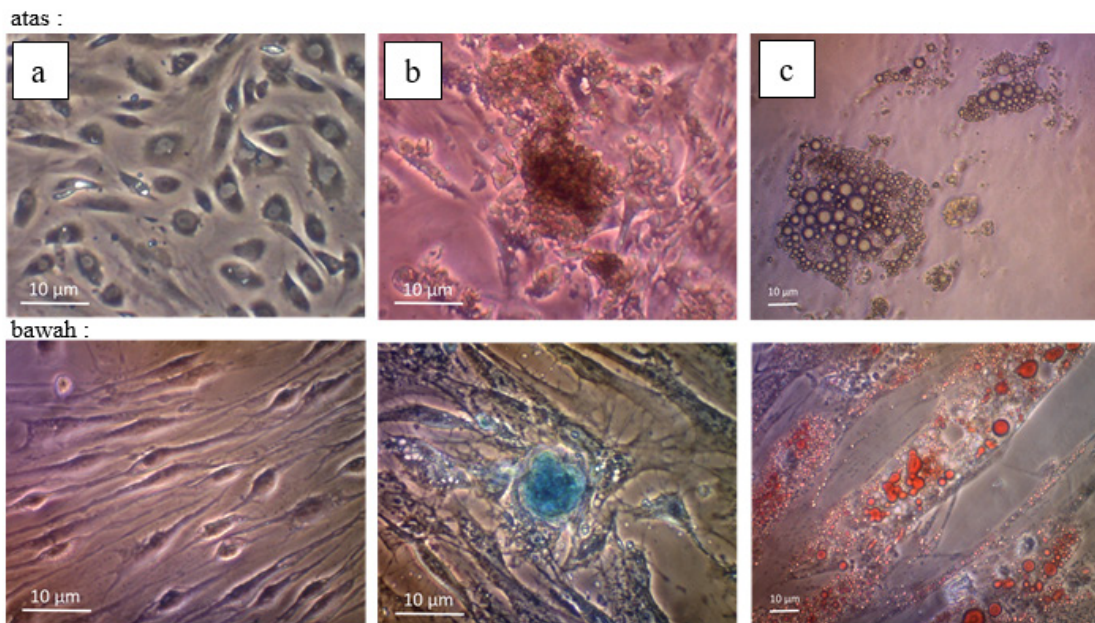
Sel punca mesenkimal memiliki kapasitas pembaruan diri dan berpotensi untuk berdiferensiasi menjadi garis keturunan sel khusus, termasuk osteosit, adiposit, dan kondrosit (Ullah *et al.*, 2015). Populasi sel yang telah terkonfirmasi sebagai SPM diinduksi untuk berdiferensiasi. Hasil diferensiasi dan pewarnaan sel disajikan pada Gambar 4. Perubahan morfologi ini sudah mulai dapat terlihat pada hari ke-7, dalam populasi sel tersebut masih ditemukan morfologi SPM dan beberapa sel mengalami kematian. Pada



Gambar 1. Jaringan adiposa coklat hasil biopsi



Gambar 2. Morfologi sel punca esenkimal jaringan adiposa coklat pada hari ketujuh



Gambar 4. Diferensiasi sel punca mesenkimal asal jaringan adiposa coklat menjadi (a) osteosit (b) kondrosit (c) adiposit. (baris atas sebelum diwarnai dan bawah setelah diwarnai)

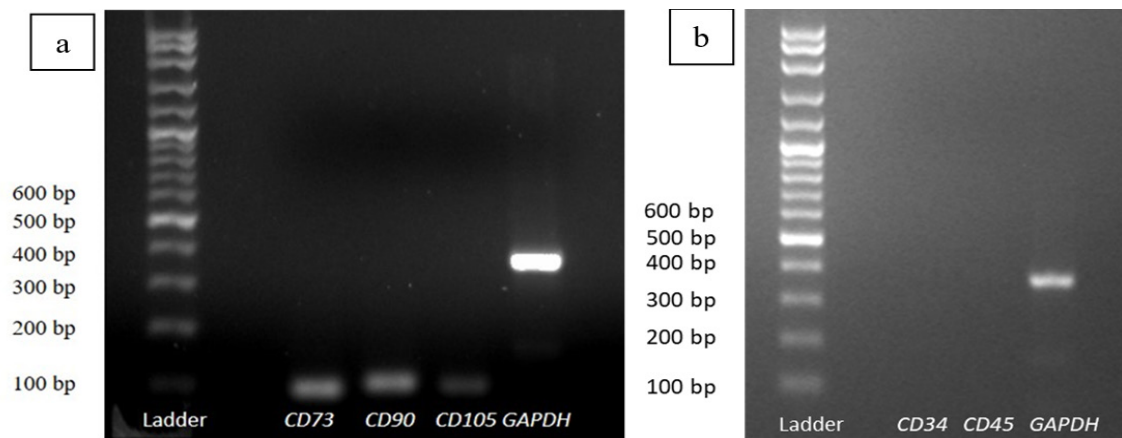
hari ke-14, hampir seluruh sel menunjukkan perubahan morfologi menjadi bentuk sedikit memanjang untuk osteosit, berbentuk *aggrekan* pada kondrosit dan memanjang menjadi kuboid pada diferensiasi adiposit. *Aggrekan* merupakan komponen proteoglikan utama pada tulang rawan articular (Kiani *et al.*, 2002).

Kultur sel dilanjutkan sampai hari ke-21 dan terlihat morfologi sel pada masing-masing diferensiasi sudah seragam sesuai dengan jenis

Tabel 2. Hasil *scoring* pewarnaan sel punca mesenkimal setelah diferensiasi

Diferensiasi	<i>M. fascicularis</i>		
	#1	#2	#3
Adiposit	+++	+++	+++
Kondrosit	+++	++	++
Osteosit	++	++	+

Keterangan: +++ (>50% sel terwarnai); ++ (10%-50% sel terwarnai); + (<10% sel terwarnai).



Gambar 3. Hasil elektroforesis sel punca mesenkimal asal jaringan adiposa coklat. Keterangan: a. gen penanda positif SPM: CD73 (101bp), CD90 (105bp), CD105 (104bp); b. gen penanda negatif SPM: CD34 (380 bp), CD45 (167 bp); gen kontrol GAPDH (352bp)

selnya. Pewarnaan dilakukan pada masing-masing sel terdiferensiasi, yaitu dengan pewarna *Alizarin red* (osteosit), *Alcian blue* (kondrosit), *Oil red O* (adiposit). Hasil pewarnaan menunjukkan adanya deposit kalsium berwarna jingga kecoklatan pada osteosit, *aggrecan* pada kondrosit berwarna biru dan deposit lemak warna merah pada adiposit. Hasil pewarnaan kemudian dilakukan *scoring* yang disajikan pada Tabel 2.

Teknik *scoring* mengacu pada De Ryeke *et al.* (2009) yang hasilnya dibagi tiga kriteria skor. Adiposit memiliki skor tertinggi dibanding jalur diferensiasi lainnya dengan jumlah sel terwarnai lebih besar dari 50%. Hal ini dapat terjadi mengingat SPM yang didiferensiasi berasal dari sel adiposa sehingga potensi diferensiasi menjadi jenis sel asalnya lebih besar. Mohammed-ahmed *et al.* (2008) menyatakan bahwa secara umum sel punca yang berasal dari sel adiposa menunjukkan proliferasi dan kapasitas adipogenik yang secara signifikan lebih tinggi dengan pembentukan vesikel lipid lebih besar dibanding sel punca asal sumsum tulang belakang. Selain asal sel, media diferensiasi dan kepadatan populasi sel punca merupakan salah satu faktor penting dalam perubahan SPM berdiferensiasi menjadi garis keturunan tertentu. Hal tersebut juga dinyatakan oleh Bunnell *et al.* (2008), bahwa diferensiasi sel punca secara *in vitro* diatur oleh beberapa kriteria, di antaranya (1) kehadiran sel punca yang populasinya dipelihara dengan tepat menggunakan media yang tepat, (2) kepadatan sel yang tepat dalam kultur, (3) formulasi media yang mengarah pada diferensiasi daripada

proliferasi, (4) penggunaan agen pemicu yang relevan, dan (5) penggunaan periode waktu diferensiasi yang tepat.

Hasil studi menunjukkan bahwa JAC *M. fascicularis* terbukti merupakan sumber untuk SPM. Iolat SPM tersebut mampu berdiferensiasi sesuai *lineage* menjadi beberapa jenis sel yaitu adiposit, kondrosit dan osteosit. Adiposa coklat berperan penting dalam mempertahankan suhu tubuh dan konsumsi energi melalui *thermogenesis* (Yang *et al.*, 2017). Studi yang mempelajari kultur dan kemampuan diferensiasi SPM asal JAC dapat digunakan sebagai informasi dasar untuk pengembangan SPM dalam kaitannya dengan patogenesis maupun pengobatan penyakit degeneratif seperti obesitas dan diabetes mellitus. Diperlukan studi lebih lanjut pula untuk mempelajari kemampuan SPM asal JAC berdiferensiasi menjadi adiposa coklat dan karakternya. Meskipun sel punca asal adiposa putih telah terbukti dapat berdiferensiasi pula menjadi adiposit coklat (Bostrom *et al.*, 2012), namun Silva *et al.* (2014) menyatakan bahwa diferensiasi ini mungkin kurang efisien karena perbedaan pada metabolisme dan ekspresi gen antara adiposa coklat dan adiposa putih. Adiposit coklat diduga memiliki potensi sebagai target terapi untuk obesitas, diabetes mellitus dan komplikasinya (Cypess dan Kahn, 2010). Mempertimbangkan hal tersebut, kultur SPM yang berasal dari JAC *M. fascicularis* ini dapat digunakan lebih lanjut sebagai model *in vitro* dalam penelitian dan pengembangan aplikasi kedokteran regeneratif, khususnya dalam konteks mekanisme yang melibatkan peran adiposit coklat.

## SIMPULAN

Sel punca mesenkimal (SPM) asal JAC *M. fascicularis* berhasil dikultur dengan populasi sel yang memiliki morfologi *fibroblast-like* berbentuk *spindle* membentuk *monolayer*. Populasi sel ini mengekspresikan penanda untuk SPM (CD73, CD90, dan CD105) dan tidak ada ekspresi gen penanda sel punca hematopoietik (CD34, CD45). Kultur SPM juga mampu berdiferensiasi menjadi adiposit, kondrosit, dan osteosit. Hasil studi menunjukkan bahwa JAC *M. fascicularis* dapat menjadi sumber SPM yang dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai model *in vitro* untuk studi kedokteran regeneratif.

## SARAN

Masih diperlukan pengembangan teknik isolasi SPM dari JAC *M. fascicularis* agar diperoleh sel berinti yang lebih banyak dan upaya penambahan ekstraseluler matriks pada subkultur agar mendukung ekspresi genotip dan fenotip SPM. Penelitian lanjutan menggunakan model kultur sel ini dapat dilakukan dalam kaitan dengan pengembangan terapi regeneratif, misalnya untuk kondisi obesitas dan diabetes mellitus.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) LPPM IPB atas ijin penggunaan fasilitas selama proses penelitian dan kepada semua pihak yang terlibat dalam penyelesaian karya ilmiah ini. Penelitian ini merupakan bagian dari skema penelitian *World Class Research* Kemenristekdikti dengan kontrak Nomor: 3/EI/KP.PTNNH/2019 tanggal 29 Maret 2019.

## DAFTAR PUSTAKA

- Actor JK. 2019. *Intrductory Immunology: Basic Concepts for Interdisciplinary Application*. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge. Academic Press. Doi: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00337-0>
- Alaca M, Calderon-Dominguez M, Serra D, Herrero L, Viana M. 2019. Mechanisms of impaired brown adipose tissue recruitment in obesity. *Front Physiol* 10(94): 1-10. Doi:<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00094>
- Ayatollahi M, Geramizadeh B, Zakerinia M, Ramzi M, Yaghoobi R, Hadadi P, Rezvani AR, Aghdai M, Azarpira N, Karimi H. 2012. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell: A source for cell-based therapy. *Int J Organ Transplant Med* 3(1): 32-41.
- Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Rad AA, Assadzadeh-Aghdai H, Sharifian A, Zali MR. 2017. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 10(3): 208-213.
- Berebichez-Fridman R, Gómez-García R, Granados-Montiel J, Berebichez-Fastlicht E, Olivos-Meza A, Granados J, Velasquillo C, Ibarra C. 2017. The holy grail of orthopedic surgery: Mesenchymal stem cells - Their current uses and potential applications. *Stem Cells Int* 2017(2638305): 1-14. Doi: 10.1155/2017/2638305.
- Berebiches-Fridman R, Montero-Olvera PR. 2018. Source and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Sultan Qaboos Univ Med J* 18(3): 264-277. Doi:10.18295/SQUMJ.2018.18.03.002
- Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind Bf, TuH, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. 2012. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481: 463-468.
- Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimble JM. 2008. *Methods in Molecular Biology, Vol 456: Adipose Tissue Protocols*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey. Humana Press.
- Cope EL. 2014. Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Microglial-Like Cells [PhD Thesis]. Wales, UK. School of Biosciences, Cardiff University.
- Cypess AM, Kahn CR. 2010. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin in Endocrinol Diabetes Obes* 17(2): 143-149. Doi:10.1097/MED.0b013e328337a81f.
- De Rycke MS, Andersen JD, Harrington KM, Pambuccian SE, Kalloger SE, Boylan KLM, Argenta PA, Skubitz APN. 2009.



- S100A1 expression in ovarian and endometrial endometrioid carcinomas is a prognostic indicator of relapse-free survival. *Am J Clin Pathol* 132: 846–856.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315–317. Doi: 10.1080/14653240600855905
- Guadamillas MC, Cerezo A, del Pozo MA. 2011. Overcoming anoikis – pathways to anchorageindependent growth in cancer. *J Cell Sci* 124: 3189-3197. Doi:10.1242/jcs.072165
- Gunawardana SC, Piston DW. 2012. Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* 61: 674-682
- Harsoyo A, Sajuthi D, Boediono A, Yuniadi Y, Suparto IH. 2018. Peripheral blood mesenchymal stem cell isolated from Indonesian long tail monkey (*Macaca fascicularis*). *Acta Vet Indones* 6(2): 56-69.
- Harsan, Mariya S, Sajuthi D, Islam AA, Wahjoepramono EJ, Yusuf I. 2015. Isolation of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *InaBJ* 7(3): 153-156. Doi: 10.18585/inabj.v7i3.181
- He J, Ruan G, Yao X, Liu J, Zhu X, Zhao J, Pang R, Li Z, Pan X. 2017. Chronic toxicity test in cynomolgus monkeys for 98 days with repeated intravenous infusion of cynomolgus umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem* 43(3): 891–904. Doi:10.1159/000481639
- Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC dan Bunnell BA. 2005. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev* 14: 440-451
- Kates AL, Park IRA, Himms-Hagen J, Mueller RW. 1990. Thyroxine 5'-deiodinase in brown adipose tissue of the cynomolgus monkey *Macaca fascicularis*. *Biochem Cell Biol* 68(1): 231-237. Doi:10.1139/o90-031.
- Kaufman DS, Lewis RL, Hanson ET, Auerbach R, Plendi J, Thomson JA. 2014. Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells. *Blood* 103(4): 1325-1332.
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. 2002. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 12(1): 19-32. Doi:10.1038/sj.cr.7290106.
- Lee P, Swarbrick MM, Ho KKY. 2013. Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance. *Endocr Rev* 34(3): 413–438. Doi:10.1210/er.2012-1081
- Mao AS, Mooney DJ. 2015. Regenerative medicine: current therapies and future directions. *PNAS* 112(47): 14452-14459. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>
- Mariya S, Dewi FNA, Suparto IH, Wilkerson GK, Cline JM, Permanawati, Iskandriati D, Budiarsa IN, Sajuthi D. 2017. Mammary gland cell culture of *Macaca fascicularis* as a reservoir for stem cells. *Hayati J Biosci* 24(3): 136–141. Doi:10.1016/j.hjb.2017.09.002
- Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, Idris SB. 2018. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther* 9(168): 1-15
- Ren Z, Wang J, Zou C, Guan Y, Zhang YA. 2010. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from different age groups of cynomolgus monkeys. *Sci China Life Sci* 53(5): 563–572. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11427-010-0083-7>
- Silva FJ, Holt DJ, Vargas V, Yockman J, Boudina, S, Atkinson D, Grainer DW, Revelo MP, Sherman W, Bull DA, Patel AN. 2014. Metabolically active human brown adipose tissue derived stem cells. *Stem Cells* 32(2): 572–581. Doi:10.1002/stem.1595.
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, Lee MY, Takahashi H, So K, Hitchcox KM, Markan KR, Hellbach K, Hirshman MF, Tseng Y, Goodyear LJ. 2015. A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. *Diabetes* 64: 2002-2014

- Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma H, Ma PX, Atala A, dan Zhang Y. 2010. Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *Biomaterials*, 31: 870-877. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.001>
- Ullah I, Subbarao RB, dan Rho GJ. 2015. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Biosci Rep*, 35: 191-196. Doi: 10.1042/BSR20150025
- Utomo TS. 2012. Stem cell research development and its protection in Indonesia. *Mimbar Hukum* 24(3): 377-569
- Williams JK, Mariya S, Suparto I, Lankford S, dan Andersson K. 2018. Cell versus chemokine therapy effects on cell mobilization to chronically dysfunctional urinary sphincters of nonhuman primates. *Int Neuroirol J*, 22(4): 260-267. Doi: <https://doi.org/10.5213/inj.1836126.063>
- Yang JP, Anderson AE, McCartney A, Ory X, Ma G, Pappalardo E, Bader J, dan Elisseff JH. 2017. Metabolically active three-dimensional brown adipose tissue engineered from white adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*, 23(7-8): 253-262. Doi:10.1089/ten.tea.2016.0399.
- Zhang W, Bi S. 2015. Hypothalamic regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis. *Front Endocrinol*, 6(136): 1-6. Doi:10.3389/fendo.2015.00136