



KONDROGENESIS ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS MENGGUNAKAN PLATELET-RICH PLASMA PADA SCAFFOLD SUTRA

CHONDROGENESIS OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS SUPPLEMENTED BY PLATELET-RICH PLASMA CULTURED ON SILK FIBROIN SCAFFOLD

Imam Rosadi^{1,5*}, Karina^{1,2,3}, Komang A. Wahyuningsih^{1,2,4}, Iis Rosliana¹, Tias Widyastuti¹, Siti Sobariah¹, Irsyah Afini¹, Anggraini Barlian⁵

¹HayandraLab, Yayasan Hayandra Peduli, Jakarta, Indonesia

²Klinik Hayandra, Yayasan Hayandra Peduli, Jakarta, Indonesia

³Biomedik, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

⁴Histologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta, Indonesia

⁵Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia

*Corresponding author: imam.rosadi@hayandra.com

Naskah Diterima: 22 Juli 2019; Direvisi: 29 Agustus 2019; Disetujui: 16 September 2019

Abstrak

Studi tentang kemampuan *adipose-derived stem cells* (ADSCs) sebagai sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi kondrosit menggunakan *platelet-rich plasma* (PRP) sebagai substitusi *fetal bovine serum* (FBS) telah banyak dilaporkan. Penggunaan medium pertumbuhan dengan kombinasi ADSCs, PRP dan *scaffold* sutra masih belum banyak dipelajari dalam rekayasa jaringan kartilago. Studi ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh medium yang mengandung 5%, 10% dan 20% PRP terhadap proses kondrogenesis ADSCs manusia yang dikultur pada *scaffold* sutra *Bombyx mori* Indonesia. Metode penelitian diawali dengan pembuatan *scaffold* sutra menggunakan metode *salt-leaching*, isolasi dan kultur ADSCs manusia dari jaringan lemak, uji pertumbuhan ADSCs pada *scaffold* sutra dengan variasi konsentrasi PRP pada medium serta analisis kadar glikosaminoglikan (GAG). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ADSCs yang dikultur menggunakan PRP lebih tinggi laju pertumbuhannya dibandingkan dikultur menggunakan FBS selama 7 hari pengamatan. Kadar GAG yang disekresikan ADSCs kelompok PRP juga lebih tinggi dibandingkan kelompok FBS. Kadar GAG tertinggi pada hari ke-21 pengamatan adalah medium yang mengandung 20% PRP kemudian 10% dan 5%, sedangkan kadar GAG kelompok kontrol cenderung stabil pada kadar yang rendah. Berdasarkan hasil tersebut, medium yang mengandung PRP memiliki potensi dalam menginduksi kondrogenesis ADSCs yang dikultur pada *scaffold* sutra.

Kata kunci: ADSCs; Glikosaminoglikan; Kondrogenesis; *Platelet-rich plasma*; *Scaffold* sutra

Abstract

The studies on *adipose-derived stem cells* (ADSCs) differentiation into chondrocytes using *platelet-rich plasma* (PRP) as a substitute of *fetal bovine serum* (FBS) have been reported. However, the combination of ADSCs, PRP and *silk fibroin scaffold* has not been widely studied for developing cartilage engineering. Therefore, the aim of this research is to study the effect of medium containing 5%, 10% and 20% PRP towards chondrogenesis of human ADSCs cultured on *silk fibroin scaffold* from *Bombyx mori* Indonesia. At first, the *silk fibroin scaffold* was fabricated using *salt-leaching* method, then ADSCs were isolated and cultured from adipose tissues. The assays of growth curve and biocompatibility of *silk fibroin scaffold* toward ADSCs supplemented by PRP as well as glycosaminoglycans (GAG) concentration was done later. The results showed that higher absorbance of proliferation rate was on ADSCs supplemented by various PRP concentrations compare to FBS control group for seven days of observation. Level of GAG which secreted by ADSCs supplemented by the various concentration of PRP, was also higher than the FBS group. The highest level of GAG on day 21 was observed in 20% PRP group then 10% and 5% PRP, while the control group of GAG level is stable at low levels. The conclusion of this study is that PRP has potential serum to induce chondrogenesis ADSCs which cultured on *silk fibroin scaffold*.

Keywords: ADSCs; Chondrogenesis; Glycosaminoglycans; *Platelet-rich plasma*; *Silk fibroin scaffold*

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v13i1.12053>

PENDAHULUAN

Adipose-derived stem cells (ADSCs) merupakan sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel, salah satunya menjadi kondrosit (Zuk, 2010). Kondrogenesis ADSCs umumnya diinduksi menggunakan medium yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS) dan *transforming growth factor beta* (TGF- β). Kadar TGF- β yang optimal akan meningkatkan potensi diferensiasi ADSCs menjadi kondrosit (Huang *et al.*, 2013; Dhurat & Sukesh, 2014). Namun, faktor diferensiasi TGF- β tidak ekonomis, sementara FBS beresiko membawa kontaminan seperti prion dan dapat menimbulkan reaksi inflamasi pada tubuh manusia (Shahdadfar, Frønsdal, Haug, Reinholt, & Brinchmann, 2005). Alternatif medium pertumbuhan pengganti FBS yang telah dilaporkan mampu meningkatkan laju proliferasi sel mamalia adalah *platelet rich plasma* (PRP) atau konsentrat trombosit asal manusia (Kocaoemer, Kern, Klüter, & Bieback, 2007; Blande *et al.*, 2009). PRP juga dilaporkan mengandung TGF- β , sehingga mampu menginduksi ADSCs menjadi kondrosit. Kondrosit memiliki protein spesifik yang diekspresikan sebagai ciri dari kondrosit. Beberapa penanda protein spesifik tersebut diantaranya kolagen tipe 2, agrekan, dan glikosaminoglikan (GAG) yang diekspresikan dalam kadar yang tinggi (Shen, Gao, Zhang, & He, 2015). Ketiga penanda tersebut membentuk matriks ekstraseluler kondrosit. Oleh karena itu, kombinasi ADSCs dan PRP berpotensi sebagai model sel punca dalam mempelajari proses kondrogenesis.

Studi tentang kondrogenesis secara *in vitro* umumnya menggunakan *scaffold* untuk memahami proses molekuler yang terjadi, sehingga menyerupai kondisi alami *in vivo*. *Scaffold* merupakan salah satu komponen utama dalam pengembangan rekayasa jaringan yang berperan sebagai tempat tumbuh sel. Modifikasi dan studi rekayasa jaringan terus dilakukan untuk mendapatkan material yang ideal dalam pengembangan rekayasa jaringan (Evans, Gentleman, & Polak, 2006; Meinel *et al.*, 2004). Suatu material dapat digunakan sebagai *scaffold* dalam teknologi rekayasa jaringan harus memenuhi beberapa kriteria. Kriteria tersebut diantaranya harus bersifat

biodegradable, *biocompatible*, mendukung penempelan, pertumbuhan dan diferensiasi sel, serta dapat dibentuk menjadi struktur tertentu seperti bentuk 3 dimensi (3D) berpori (*sponge*) (Correia *et al.*, 2012).

Biocompatible merupakan kondisi di mana material *scaffold* tidak bersifat toksik bagi sel dan tidak menimbulkan respon imun secara *in vivo*. *Scaffold* yang bersifat *biodegradable* adalah bahan material yang dapat terdegradasi dan terserap oleh tubuh sehingga dapat digantikan oleh matriks alami (Evans *et al.*, 2006). Hal lain yang perlu diperhatikan dalam menentukan bahan material *scaffold* untuk rekayasa jaringan tertentu, yakni faktor kekerasan, kekuatan, kelenturan dan elastisitas *scaffold* (Altman *et al.*, 2003). *Scaffold* berdasarkan sumbernya dapat dibagi menjadi 2 yaitu berbahan dasar alami dan sintetis. Kolagen, fibrin, sutra, alginat, hialuronan dan kitosan merupakan beberapa jenis *scaffold* alami yang telah digunakan dalam studi rekayasa jaringan. Pengembangan *scaffold* sintetis yang telah dilaporkan adalah *Poly (lactic-co-glycolic acid)* (PLGA), *Poly (ethylene glycol)* (PEG), dan keramik. Material *scaffold* berbahan dasar alami dan sintetis tersebut telah digunakan dalam studi rekayasa jaringan kartilago (Willerth & Sakiyama-Elber, 2008). *Scaffold* sutra dilaporkan memiliki karakteristik yang baik dalam menunjang rekayasa jaringan kartilago (Wang, Kim, Blasioli, Kim, & Kaplan, 2005; Meinel *et al.*, 2004; Hofmann, *et al.*, 2006). Oleh karena itu, pada studi ini dilakukan pengembangan *scaffold* sutra asal *Bombyx mori* Indonesia yang memiliki ukuran pori 500 μm . Tujuan dari studi ini adalah untuk mengetahui potensi kombinasi ADSCs dengan medium pertumbuhan PRP pada *scaffold* sutra dalam pengembangan rekayasa jaringan kartilago. Analisis yang dilakukan diantaranya pengujian biokompatibilitas *scaffold* sutra dan pengukuran kadar GAG sebagai marker dari kondrosit.

MATERIAL DAN METODE

Pembuatan *Scaffold* Sutra

Pembuatan *scaffold* sutra asal ulat sutra (*Bombyx mori*) mengacu pada metode Wang *et al.* (2005) dengan modifikasi. Sutra yang terdegumisasi dilarutkan dalam 8% w/v CaCl_2 /asam format hingga didapatkan konsen-

trasi akhir 12% w/v. Campuran kedua-nya dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit, lalu ditambahkan garam (NaCl) ukuran 500 µm dengan perbandingan 5:1, kemudian dihomogenisasi menggunakan batang pengaduk dan dicetak hingga permukaan rata. *Scaffold* dikering-anginkan selama semalam, kemudian direndam dalam alkohol 70% selama 30 menit. *Scaffold* direndam dalam akuabides selama tiga hari dengan penggantian akuabides hingga *scaffold* bebas garam. Pengukuran pH akuabides akhir dilakukan untuk memastikan pH air mendekati nilai pH akuabides sebelum digunakan untuk merendam *scaffold*. *Scaffold* yang tercetak (diameter 3 cm), kemudian dikeringkan menggunakan tisu beberapa saat dan disimpan dalam *freezer* -80 °C selama 30 menit kemudian ditimbang berat *scaffold*. *Scaffold* dipotong dengan ukuran 5 mm x 5 mm dan ditimbang, serta kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dan siap untuk digunakan.

Kultur Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs)

Jaringan lemak diisolasi secara enzimatik menggunakan enzim H-Remedy yang telah dipatenkan oleh Yayasan Hayandra Peduli (Nomor Paten: IDP000055609). Sebanyak 10% enzim H-Remedy ditambahkan pada sampel jaringan lemak dan diinkubasi pada suhu 37 °C, 300 rpm, selama 1 jam. Enzim kemudian dinaktivasi dengan menambahkan medium *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) rendah glukosa (1 g/L) mengandung L-glutamin (4 mM) dan disentrifugasi pada kecepatan 600 x g selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk pada lapisan bagian atas kemudian dibuang, dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 600 x g selama 10 menit. Pelet sel yang mengandung *adipose-derived stem cells* (ADSCs) dikultur menggunakan medium DMEM yang mengandung 1% *antibiotic-antimycotic* (Gibco, 100x) dan 10% *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco) pada suhu 37 °C, 5% CO₂. ADSCs kemudian disubkultur hingga pasase 4 (P4) untuk digunakan pada uji selanjutnya. Penelitian ini telah lulus kaji etik dengan nomor 666/UN6.C.10/PN/2017 oleh Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung.

Platelet Rich Plasma (PRP)

Platelet Rich Plasma (PRP) asal donor manusia diperoleh dari Palang Merah Indonesia (PMI), DKI Jakarta dengan melampirkan proposal dan surat lulus kaji etik dari FK UNPAD. Bahan PRP digunakan sebagai substitusi FBS.

Perlakuan ADSCs

Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) dikultur pada *scaffold* sutra yang memiliki ukuran pori 500 µm dibagi menjadi 4 kelompok berdasarkan konsentrasi serum. Sebanyak 1 x 10⁵ ADSCs pasase 4 dikultur pada *scaffold* sutra dengan berbagai medium, yaitu DMEM mengandung 10% FBS, 5% PRP, 10% PRP dan 20% PRP. Pengujian biokompatibilitas *scaffold* sutra dilakukan pada hari ke-1, 3, 5, dan 7. Pada setiap hari pengamatan, medium sel setiap kelompok dibuang dan dibilas dengan *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, Gibco). Selanjutnya, sel ditambahkan 100 µl DMEM (Gibco) dan 10 µl reagen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) ke dalam 96 *well-plate*. Sel kemudian diinkubasi selama 4 jam. Larutan dalam *well* dibuang lalu ditambahkan 100 µl DMSO dan diinkubasi selama 10 menit di dalam inkubator (Thermo Fisher Scientific). Larutan dalam *well* kemudian dipindahkan ke dalam 96 *well-plate* baru dan diamati absorbansinya menggunakan *microplate reader* (Biorad iMark) dengan panjang gelombang 595 nm.

Selanjutnya uji glikosaminoglikan (GAG) dilakukan untuk mengukur glikosaminoglikan dari ADSCs yang mengalami diferensiasi menjadi kondrosit. Pengamatan dilakukan pada hari ke-1, 3, 5, 7, 14, dan 21. Sel pada hari pengamatan difiksasi menggunakan paraformaldehid 4% selama 15 menit kemudian paraformaldehid 4% dibuang dan ditambahkan 100 µl *alcian blue* 1% dalam 3% asam asetat selama 30 menit. *Alcian blue* kemudian dibuang dan dicuci menggunakan 3% asam asetat selama 2 menit dengan pengulangan sebanyak 3 kali. De-ion ditambahkan dan diinkubasi selama 2 menit. Sel yang telah dicuci kemudian dilarutkan dalam 1% *sodium dodecyl sulfate* (SDS) sebanyak 100 µl dan diinkubasi menggunakan *shaker* kecepatan 200 rpm selama 30 menit. Pembacaan absorbansi

pada gelombang 595 nm menggunakan *microplate reader*.

Analisis Data

Data yang didapat ditampilkan dalam bentuk gambar dan grafik (dinyatakan dalam rerata \pm standar deviasi (SD)). Analisis statistik dimulai dengan uji normalitas dan homogenitas. Analisis perbedaan menggunakan uji statistik parametrik *analysis of variance* (ANOVA).

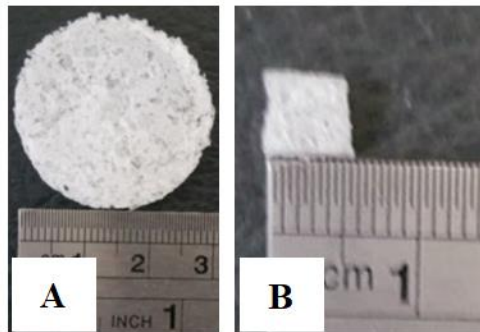
HASIL

Scaffold Sutra

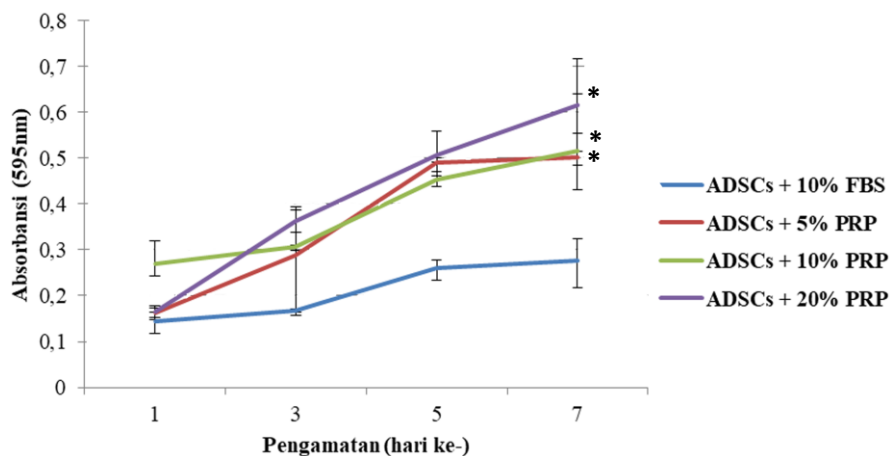
Scaffold sutra yang terbentuk berdiameter 3 cm dengan ketebalan 1 mm (Gambar 1A). *Scaffold* sutra yang digunakan untuk pengujian biokompatibilitas dan kadar GAG ADSCs dalam medium mengandung PRP berukuran 5 x 5 mm (Gambar 1B). *Scaffold* sutra yang dibuat memiliki ukuran pori sebesar $\pm 500\mu\text{m}$.

Biokompatibilitas dan Pertumbuhan ADSCs

ADSCs yang dikultur pada medium mengandung FBS dan berbagai konsentrasi PRP cenderung mengalami peningkatan absorbansi hingga hari terakhir pengamatan (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa *scaffold* sutra bersifat tidak toksik bagi sel dan mendukung pertumbuhannya. Laju proliferasi ADSCs tertinggi adalah ADSCs kelompok 20% PRP kemudian 10% PRP, 5% PRP dan 10% FBS. Berdasarkan hari ke-7 pengamatan sel, terdapat hubungan antara tingginya konsentrasi PRP terhadap laju proliferasi ADSCs (Gambar 2). Pada hari ke-7, kelompok ADSCs yang dikultur pada medium mengandung 20% PRP meningkat 3,7x lipat, kemudian kelompok 5% PRP sebesar 3,1x lipat, 10% PRP dan 10% FBS sebesar 1,9x lipat dan 1,9x lipat dibandingkan pengamatan hari ke-1. Hasil ini menunjukkan bahwa *scaffold* sutra tidak bersifat toksik dan baik bagi pertumbuhan ADSCs.



Gambar 1. *Scaffold* sutra yang memiliki ukuran pori 500 μm (A), yang dipotong menjadi ukuran 5 x 5 mm (B)

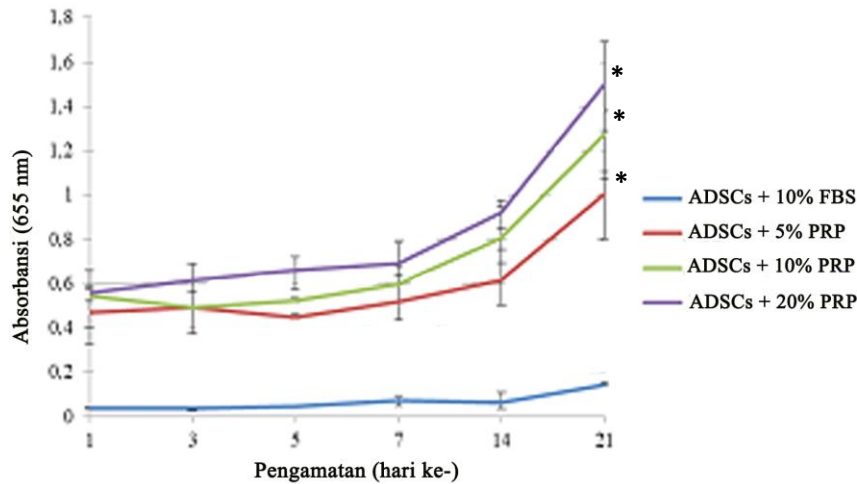


Gambar 2. Biokompatibilitas dan pertumbuhan *Adipose-Derived Stem Cells* (ADSCs) terhadap *scaffold* sutra pada medium yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS) dan berbagai konsentrasi *Platelet Rich Plasma* (PRP). Pertumbuhan ADSCs pada medium PRP (5%, 10%, dan 20%) pengamatan hari ke-7 lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kontrol (* $p < 0,05$)

Kadar Glikosaminoglikan (GAG)

Kadar GAG pada ADSCs yang dikultur menggunakan medium yang mengandung PRP (5%, 10%, dan 20%) lebih tinggi dibandingkan medium yang mengandung 10% FBS. Kelompok PRP cenderung mengalami peningkatan kadar GAG selama hari pengamatan, sedangkan kelompok FBS cenderung stabil pada kadar yang rendah hingga hari ke-21 pengamatan. Semakin tinggi

konsentrasi PRP maka semakin tinggi kadar GAG yang terdeteksi. Oleh karena itu, pada hari ke-21 kelompok ADSCs yang dikultur menggunakan 20% PRP terdeteksi memiliki kadar GAG tertinggi kemudian diikuti oleh kelompok 10% PRP, dan 5% PRP. Kadar absorbansi GAG kelompok PRP pada hari ke-21 lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol (Gambar 3).



Gambar 3. Kadar glikosaminoglikan *Adipose-Derived Stem Cells* (ADSCs) yang dikultur pada *scaffold* sutra menggunakan medium mengandung 10% FBS (kontrol), 5% PRP, 10% PRP dan 20% PRP. Kelompok PRP (5%, 10%, dan 20%) kadar GAG lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kontrol (* $p < 0,05$)

PEMBAHASAN

ADSCs memanfaatkan beberapa protein yang terkandung dalam medium maupun protein yang disekresikan oleh sel secara autokrin untuk bertahan hidup. Protein yang berperan penting dalam faktor pertumbuhan untuk pertumbuhan sel adalah *fibroblast growth factor* (FGF) (Gentile *et al.*, 2012; Wang, Kim, Vunjak-Novakovic, & Kaplan, 2006) dan beberapa faktor pertumbuhan lainnya yang berperan dalam stimulasi ekspresi gen-gen dalam proses pembelahan sel. PRP dilaporkan mengandung beberapa faktor pertumbuhan, yaitu FGF, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β), dan *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) (Kang, Jeon, & Song, 2005; Palumbo, Tsai, & Li, 2014; Atashi, Jaconi, Pittet-Cuenod, & Modarressi, 2014).

Ikatan PDGF, FGF dan MIF dengan reseptornya akan menstimulasi persinyalan AKT, namun molekul VEGF yang

disekresikan oleh ADSCs maupun yang terkandung dalam medium tidak berinteraksi dengan reseptor VEGF, karena ADSCs tidak mengekspresikan reseptor VEGF. Akan tetapi, VEGF akan berinteraksi dengan reseptor PDGF untuk menginisiasi pembelahan sel melalui jalur AKT (Atashi *et al.*, 2014). Ikatan molekul lain seperti TGF- β dan reseptornya menginisiasi jalur pensinyalan Smad2. Protein Smad2 akan membentuk heterodimer dengan Smad3 yang memicu inisiasi pertumbuhan ADSCs di nukleus. Aktivasi jalur AKT/Smad2 akan meningkatkan pertumbuhan ADSCs sehingga ekspresi protein-protein terkait siklus sel seperti protein D1 siklin menjadi lebih tinggi (Atashi, Serre-Beinier, Nayernia, Pittet-Cuénod, & Modarressi, 2015).

Laju proliferasi ADSCs kelompok PRP lebih tinggi dari FBS diduga disebabkan oleh tingginya konsentrasi MIF dan TGF- β pada medium PRP dibandingkan dengan FBS. Meskipun konsentrasi MIF pada PRP lebih tinggi dari FBS, namun hal tersebut tidak merubah ekspresi *endogenous* ADSCs dalam

mensekresikan MIF. Oleh karena itu, ADSCs yang dikultur menggunakan PRP dilaporkan lebih banyak mengaktivasi jalur AKT dan Smad2 daripada ADSCs yang dikultur menggunakan medium mengandung FBS (Atashi *et al.*, 2015). Produk reaksi tersebut memicu protein D1 siklin yang diekspresikan lebih banyak sehingga laju proliferasi ADSCs PRP lebih tinggi daripada FBS. Pada studi ini, tingginya pertumbuhan ADSCs sejalan dengan tingginya kadar GAG pada kelompok PRP yang menunjukkan adanya pergeseran sifat kepuncaan sel menjadi kondrosit. Potensi PRP dalam mendukung pertumbuhan dan diferensiasi ADSCs menjadi kondrosit secara *in vitro* juga dilaporkan oleh Shen *et al.* (2015).

Pada prinsipnya, *alcian blue* akan mewarnai polisakarida yang bersifat asam seperti GAG (Frazier, Roodhouse, Hourcade, & Zhang, 2008; Whiteman, 1973). Komponen GAG berfungsi memediasi interaksi sel dengan ligan ekstraseluler dan molekul adesi lainnya. GAG juga dilaporkan mampu menciptakan lingkungan mikro spesifik bagi sel untuk membentuk pertahanan fisik atau biokimia. Hal ini menyebabkan terbentuknya pertahanan selektif berdasarkan ukuran molekul (Gasimli *et al.*, 2014). ADSCs yang dikultur pada medium yang mengandung PRP tidak hanya meningkatkan kemampuan pertumbuhan sel, namun juga produksi protein GAG. Hal tersebut ditunjukkan pada Gambar 3, yaitu ADSCs kelompok perlakuan PRP (5%, 10%, dan 20%) secara stabil mengalami peningkatan hingga hari ke-21. Nilai persentase tersebut dapat dinyatakan sebagai bentuk adanya deposit GAG oleh sel (Trujillo & Popat, 2014).

Kemampuan PRP dalam meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi ADSCs menjadi kondrosit juga dilaporkan oleh Van Pham *et al.* (2013) dan Pawitan *et al.* (2014). Medium yang mengandung PRP mendukung kondrogenesis ADSCs yang ditandai dengan meningkatnya ekspresi kolagen tipe 2, Sox9, dan agrekan sebagai marker kondrosit. Pengaruh PRP pada diferensiasi ADSCs menjadi kondrosit dipelajari secara *in vitro* dengan variasi konsentrasi PRP 10%, 15%, dan 20%. Hasilnya menunjukkan adanya potensi PRP sebagai induktor kondrogenesis ADSCs. Studi lanjutan untuk mengetahui kemampuan ADSCs dalam menyembuhkan jaringan

kartilago yang rusak secara *in vivo* diamati menggunakan hewan model tikus dengan melakukan kombinasi ADSCs-PRP. Hasilnya menunjukkan bahwa kombinasi ADSCs-PRP memberikan pemulihan jaringan kartilago pada hewan model tikus yang lebih baik dibandingkan kontrol (Van Pham *et al.*, 2013). Pada studi ini, untuk kelompok ADSCs kontrol menggunakan medium FBS juga terdeteksi adanya GAG namun dengan absorbansi yang sangat rendah.

Berdasarkan studi pendahuluan dilaporkan bahwa GAG juga terdapat pada sel punca manusia. Berdasarkan jenis GAG yang ada pada sel punca manusia, GAG membentuk lingkungan mikro sendiri bagi sel untuk menjaga laju proliferasi sel. Akan tetapi, kondisi ini tidak dapat dipertahankan sel saudara, ketika sel mengalami pembelahan. Sel punca yang membelah akan ditranslokasikan keluar dari kondisi mikro yang dibuat oleh GAG sehingga sel tersebut tidak terproteksi dan akan terpapar oleh protein yang ada disekitarnya (Gasimli *et al.*, 2014; da Costa, Reis, & Pashkuleva, 2017). Pada kondisi ini, sel punca akan membelah atau berdiferensiasi sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan mikro sekitar. Selain itu, GAG yang terdapat pada sel punca dalam jumlah terbatas merupakan GAG yang miskin akan sulfat sehingga tidak terdeteksi (sangat rendah) oleh *alcian blue*. Sebaliknya, kondrosit memiliki banyak GAG yang kaya akan variasi gugus sulfat.

Beberapa jenis GAG yang terdapat pada matriks ekstraseluler kondrosit diantaranya kondroitin sulfat, keratin sulfat, dan dermatan sulfat. GAG tersebut memiliki peran sebagai penjaga kestabilan kondisi osmosis untuk mencegah sel mengalami pembengkakan. Peran lainnya yaitu menghubungkan interaksi sel dan matriks ekstraseluler. Komponen melimpah lainnya yang penting dalam jaringan kartilago adalah agrekan. Agrekan diikat oleh keratin sulfat dan kondroitin sulfat sehingga agrekan juga umumnya digunakan sebagai marker kartilago (da Costa *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil studi ini menunjukkan bahwa PRP memiliki potensi dalam menginduksi ADSCs dalam rekayasa jaringan kartilago menggunakan *scaffold* sutra ukuran 500 μm .

SIMPULAN DAN SARAN

Platelet-rich plasma pada konsentrasi medium 5%, 10%, dan 20% memiliki potensi sebagai induktor bagi ADSCs menjadi kondrosit yang dikultur pada *scaffold* sutra asal *Bombyx mori* Indonesia. Diperlukan konfirmasi ulang melalui studi lanjutan dengan melakukan pengujian ekspresi gen pada kolagen tipe 2 dan agrekan sebagai protein penanda spesifik kondrosit lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih pada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) Kementerian Keuangan Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui pemberian Beasiswa Tesis, sesuai dengan Nota Perjanjian nomor: PRJ-1332 /LPDP.3/2016.

REFERENSI

- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., . . . Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24(3), 401-416. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00353-8
- Atashi, F., Jaconi, M. E., Pittet-Cuenod, B., & Modarressi, A. (2014). Autologous platelet-rich plasma: A biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion. *Tissue Engineering Part C Methods*, 21(3), 253-262. doi: 10.1089/ten.tec.2014.0206
- Atashi, F., Serre-Beinier, V., Nayernia, Z., Pittet-Cuénod, B., & Modarressi, A. (2015). Platelet rich plasma promotes proliferation of adipose derived mesenchymal stem cells via activation of AKT and Smad2 signaling pathways. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 5(8), 1-10. doi: 10.4172/2157-7633.1000301
- Blande, I., Bassaneze, V., Lavini-Ramos, C., Fae, K., Kalil, J., Miyakawa, A., . . . Krieger, J. (2009). Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion*, 49(12), 2680-2685. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02346.x
- Correia, C., Bhumiratana, S., Yan, L. P., Oliveira, A. L., Gimble, J. M., Rockwood, D., . . . Vunjak-Novakovic, G. (2012). Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia*, 8(7), 2483-2492. doi: 10.1016/j.actbio.2012.03.019
- da Costa, D. S., Reis, R. L., & Pashkuleva, I. (2017). Sulfation of glycosaminoglycans and its implications in human health and disorders. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19(1), 1-26. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044610
- Dhurat, R., & Sukesh, M. S. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 7(4), 189-197. doi: 10.4103/0974-2077.150734
- Evans, N. D., Gentleman, E., & Polak, J. M. (2006). Scaffolds for stem cells. *Materials Today*, 9(12), 26-33. doi: 10.1016/S1369-7021(06)71740-0
- Frazier, S. B., Roodhouse, K. A., Hourcade, D. E., & Zhang, L. (2008). The quantification of glycosaminoglycans: a comparison of HPLC, carbazole, and alcian blue methods. *Open Glycoscience*, 1(1), 31-39. doi: 10.2174/1875398100801010031
- Gasimli, L., Hickey, A. M., Yang, B., Li, G., dela Rosa, M., Nairn, A. V., . . . Linhardt, R. J. (2014). Changes in glycosaminoglycan structure on differentiation of human embryonic stem cells towards mesoderm and endoderm lineages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, 1840(6), 1993-2003. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.007
- Gentile, P., Orlandi, A., Scioli, M. G., Di Pasquali, C., Bocchini, I., & Cervelli, V. (2012). Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(3), 230-236. doi: 10.5966/sctm.2011-0054
- Hofmann, S., Knecht, S., Langer, R., Kaplan, D. L., Vunjak-Novakovic, G., Merkle, H. P., & Meinel, L. (2006). Cartilage-like tissue engineering using silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Tissue*

- Engineering*, 12(10), 2729-2738. doi: 10.1089/ten.2006.12.2729
- Huang, S. J., Fu, R. H., Shyu, W. C., Liu, S. P., Jong, G. P., Chiu, Y. W., . . . Lin, S. Z. (2013). Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplantation*, 22(4), 701-709. doi: 10.3727/096368912X655127
- Kang, Y. J., Jeon, E. S., & Song, H. Y. (2005). Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 95(6), 1135-1145. doi: 10.1002/jcb.20499
- Kocaoemer, A., Kern, S., Klüter, H., & Bieback, K. (2007). Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*, 25(5), 1270-1278. doi: 10.1634/stemcells.2006-0627
- Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Zichner, L., Langer, R., Kaplan, D., & Vunjak-Novakovic, G. (2004). Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(3), 379-391. doi: 10.1002/bit.20252
- Palumbo, S., Tsai, T. L., & Li, W. J. (2014). Macrophage migration inhibitory factor regulates AKT signaling in hypoxic culture to modulate senescence of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 23(8), 852-865. doi: 10.1089/scd.2013.0294
- Pawitan, J. A., Suryani, D., Wulandari, D., Damayanti, L., Liem, I. K., & Purwoko, R. Y. (2014). Prolonged culture in FBS and FBS-substitute containing media: spontaneous chondrogenic differentiation of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *International Journal of PharmTech Research*, 6(1), 224-235.
- Shahdadfar, A., Frønsdal, K., Haug, T., Reinholt, F. P., & Brinchmann, J. E. (2005). In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*, 23(9), 1357-1366. doi: 10.1634/stemcells.2005-0094
- Shen, J., Gao, Q., Zhang, Y., & He, Y. (2015). Autologous platelet-rich plasma promotes proliferation and chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 11(2), 1298-1303. doi: 10.3892/mmr.2014.2875
- Trujillo, N. A., & Popat, K. C. (2014). Increased adipogenic and decreased chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells on nanowire surfaces. *Materials*, 7(4), 2605-2630. doi: 10.3390/ma7042605
- Van Pham, P., Bui, K. H., Ngo, D. Q., Vu, N. B., Truong, N. H., Phan, N. L., . . . Phan, N. K. (2013). Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(91), 1-11. doi: 10.1186/scrt277
- Wang, Y., Kim, U. J., Blasioli, D. J., Kim, H. J., & Kaplan, D. L. (2005). In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 26(34), 7082-7094. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.022
- Wang, Y., Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L. (2006). Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, 27(36), 6064-6082. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.008
- Whiteman, P. (1973). The quantitative measurement of alcian blue-glycosaminoglycan complexes. *Biochemical Journal*, 131(2), 343-350. doi: 10.1042/bj1310343
- Willerth, S. M., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2008). Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. *Stem Journal*, 1(1), 1-25. doi: 10.3233/STJ-180001.
- Zuk, P. A. (2010). The Adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Molecular Biology of The Cell*, 21(11), 1783-1787. doi: [10.1091/mbc.e09-07-0589](https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0589).