

## **ABSTRAK**

### **DETEKSI Fc $\gamma$ RIIa PADA STEM CELL YANG DIISOLASI DARI LIPOASPIRATE**

Devina Marchita I.S., 2009. Pembimbing I : Caroline Tan Sardjono, dr.PhD  
Pembimbing II : Laella K. Liana,dr.M.Kes.Sp.P.A.

Beberapa tahun terakhir, terapi kesehatan mulai berkembang ke arah *cell-based therapy*. *Cell-based therapy* merupakan terapi dengan menggunakan *human stem cell* yang memiliki potensi untuk memperbaik sel dan jaringan. Akan tetapi, pengetahuan mengenai imunogenisitas *stem cell* masih sangatlah minim. Ini menjadi hal yang menarik bagi peneliti untuk meneliti lebih lanjut mengenai imunogenisitas *stem cell* khususnya *stem cell* yang diisolasi dari *lipoaspirate*.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ekspresi Fc $\gamma$ RIIa pada *stem cell* yang diisolasi dari *lipoaspirate*. Fc $\gamma$ RIIa merupakan molekul yang bertanggung jawab dalam proses *clearance* kompleks imun, sehingga deteksi mengenai keberadaan molekul ini akan memberikan wawasan baru mengenai profil imunogenisitas *stem cell*.

Objek penelitian ini adalah *stem cell* yang diisolasi dari *lipoaspirate*. Pertama-tama dilakukan isolasi *mononuclear cell* dari hasil *lipoaspirate* (dengan enzim *collagenase*) dan kemudian dikultur. Sebagai konfirmasi didapatkannya populasi sel MSC yang homogen, dilakukan analisa ekspresi CD45 dengan menggunakan *flow cytometry*. Setelah itu, dilakukan isolasi mRNA yang kemudian ditranskripsi balik dan diamplifikasi dengan primer *forward* dan *reverse* spesifik Fc $\gamma$ RIIa,  $\beta$ -*actin*, CD45 melalui proses *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). *Amplicon* RT-PCR tersebut dievaluasi melalui elektroforesis dan kemudian dianalisa.

Hasil kultur menunjukkan karakteristik MSC yaitu melekat di dasar *plate* kultur dan memiliki bentuk *spindle* menyerupai *fibroblast*. Analisa dengan *flow cytometry* menunjukkan bahwa MSC tidak mengekspresikan CD45. Hasil visualisasi RT-PCR dengan primer Fc $\gamma$ RIIa didapatkan *band* dengan ukuran 300 bp dan 400 bp. Hasil visualisasi RT-PCR dengan primer  $\beta$ -*actin* didapatkan *band* dengan ukuran antara 200 bp dan 250 bp. Sedangkan hasil visualisasi RT-PCR dengan primer CD45 tidak didapatkan *band*.

Kesimpulan penelitian ini adalah *stem cell* yang diisolasi dari *lipoaspirate* mengekspresikan Fc $\gamma$ RIIa yang merupakan reseptor IgG dalam bentuk kompleks imun.

**Kata kunci:** *Stem cell*, Fc $\gamma$ RIIa, *Lipoaspirate*

## **ABSTRACT**

### **DETECTION OF $Fc\gamma RIIa$ IN STEM CELL ISOLATED FROM LIPOASPIRATE**

Devina Marchita I.S., 2009. *Supervisor I : Caroline Tan Sardjono, dr.PhD  
Co-Supervisor : Laella K. Liana,dr.M.Kes.Sp.P.A.*

*Within the last few years, cell-based therapy has been rapidly developed as a potential medical treatment. Cell-based therapy offers the possibility of renewable cells and tissues using human stem cell. However, little has been known about the immunogenicity profiles of stem cell. Based on this condition, it becomes an interest for many researchers to investigate stem cell immunogenicity profiles especially those isolated from lipoaspirates.*

*The objective of this study is to detect the expression of  $Fc\gamma RIIa$  on stem cells isolated from lipoaspirate.  $Fc\gamma RIIa$  is a molecule responsible for immune complex clearance. Thus the detection of this receptor will give an insight into immunogenicity profile of stem cells.*

*Experimental object in this study was stem cell isolated from lipoaspirate. First of all, mononuclear cell was isolated from lipoaspirate (by collagenase digest). Then, the cells were cultured to isolate mesenchymal stem cell (MSC) from other mononuclear cells. Furthermore, a flow cytometry assay was done to confirm the homogenous MSC population by using CD45 as a marker for mature leukocyte. From the cultured cells mRNA was isolated and subjected to reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The amplification was done using  $Fc\gamma RIIa$ ,  $\beta$ -actin, and CD45 primers. Finally, amplicons of RT-PCR were analyzed following the electrophoresis process.*

*The cells cultured showed MSC characteristics including adherence to plastic discs and the fibroblast-like appearance. Analysis by flow cytometry confirmed the cells isolated were MSC as they lacked of CD45 expression. Visualisation of RT-PCR amplicon using  $Fc\gamma RIIa$  primer showed a band with the expected size laid between the 300 bp to 400 bp. Visualisation of RT-PCR amplicon using  $\beta$ -actin primer showed a band with the expected size laid between the 200 bp to 250 bp. Visualisation of RT-PCR amplicon using CD45 primer showed no band.*

*This study concludes that stem cell isolated from lipoaspirate expressed  $Fc\gamma RIIa$  based on the RNA detection assay using RT-PCR.*

**Key words:** Stem cell,  $Fc\gamma RIIa$ , Lipoaspirate

## DAFTAR ISI

|                          |      |
|--------------------------|------|
| JUDUL .....              | i    |
| LEMBAR PERSETUJUAN ..... | ii   |
| SURAT PERNYATAAN.....    | iii  |
| ABSTRAK .....            | iv   |
| <i>ABSTRACT</i> .....    | v    |
| KATA PENGANTAR .....     | vi   |
| DAFTAR ISI .....         | viii |
| DAFTAR TABEL .....       | x    |
| DAFTAR GAMBAR .....      | xi   |
| DAFTAR GRAFIK.....       | xii  |
| DAFTAR LAMPIRAN.....     | xiii |

### BAB I PENDAHULUAN

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 1.1 Latar Belakang Masalah .....      | 1 |
| 1.2 Identifikasi Masalah .....        | 2 |
| 1.3 Maksud dan Tujuan .....           | 2 |
| 1.4 Manfaat Penelitian.....           | 2 |
| 1.5 Kerangka Pemikiran .....          | 2 |
| 1.6 Metode Penelitian.....            | 3 |
| 1.7 Lokasi dan Waktu Penelitian ..... | 3 |

### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

|   |    |
|---|----|
| 2.1 <i>Stem cell</i> .....  | 4  |
| 2.1.1 Definisi <i>stem cell</i> .....                                 | 4  |
| 2.1.2 Karakteristik <i>stem cell</i> .....                            | 4  |
| 2.1.2 Pembagian <i>stem cell</i> .....                                | 6  |
| 2.2 <i>Mesenchymal stem cell</i> .....                                | 9  |
| 2.2.1 Definisi <i>mesenchymal stem cell</i> .....                     | 9  |
| 2.2.2 Sumber <i>mesenchymal stem cell</i> .....                       | 9  |
| 2.2.3 Karakteristik <i>mesenchymal stem cell</i> .....                | 10 |
| 2.2.4 Immunomodulasi <i>mesenchymal stem cell</i> .....               | 12 |
| 2.2.5 Aplikasi klinis <i>mesenchymal stem cell</i> .....              | 14 |
| 2.3 <i>Fragment crystallizable receptor (Fc receptor / FcR)</i> ..... | 15 |
| 2.3.1 Definisi <i>Fc receptor</i> .....                               | 15 |
| 2.3.2 <i>Fc gamma receptor</i> .....                                  | 17 |
| 2.4 <i>Flow cytometry</i> .....                                       | 20 |
| 2.5 <i>Polymerase chain reaction</i> .....                            | 25 |
| 2.6 <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> .....      | 29 |

### **BAB III METODE PENELITIAN**

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.1     | Objek Penelitian .....   | 31 |
| 3.2     | Metode Penelitian .....  | 31 |
| 3.3     | Alat dan Bahan .....   | 31 |
| 3.3.1   | Bahan-bahan yang digunakan.....  | 31 |
| 3.3.2   | Alat-alat yang digunakan.....  | 37 |
| 3.4     | Diagram Kerja .....  | 38 |
| 3.5     | Cara Kerja .....   | 39 |
| 3.5.1   | <i>Thawing cell</i> .....  | 39 |
| 3.5.1.1 | <i>Thawing mesenchymal stem cell</i> .....   | 39 |
| 3.5.1.2 | <i>Thawing peripheral blood mononuclear cell</i> .....   | 40 |
| 3.5.2   | Analisis <i>flow cytometry</i> dengan menggunakan alat<br><i>fluorescences activated cells sorting</i> ..... | 40 |
| 3.5.3   | Isolasi <i>messenger RNA</i> (mRNA).....   | 41 |
| 3.5.4   | <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> .....   | 42 |
| 3.5.5   | <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR) untuk memeriksa<br>kontaminasi DNA.....                               | 44 |

### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 4.1 | Hasil kultur <i>mesenchymal stem cell</i> (MSC) selama 14 hari..... | 46 |
| 4.2 | Deteksi ekspresi CD45 pada MSC dibandingkan dengan PBMC.....        | 47 |
| 4.3 | Deteksi ekspresi Fc $\gamma$ RIIa pada MSC .....                    | 50 |

### **BAB V KESIMPULAN**

|     |                 |    |
|-----|-----------------|----|
| 5.1 | Kesimpulan..... | 55 |
| 5.2 | Saran .....     | 55 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| DAFTAR PUSTAKA .....       | 56 |
| LAMPIRAN .....             | 60 |
| DAFTAR RIWAYAT HIDUP ..... | 63 |

## **DAFTAR TABEL**

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabel 3.1 | Primer yang digunakan .....  | 32 |
| Tabel 3.2 | <i>Master mix one step</i> RT-PCR yang digunakan dalam reaksi RT-PCR dengan primer $\beta$ -actin, Fc $\gamma$ RIIa dan CD45 ..... | 42 |
| Tabel 3.3 | Program <i>one step</i> RT-PCR dengan primer spesifik $\beta$ -actin dan Fc $\gamma$ RIIa.....                                     | 43 |
| Tabel 3.4 | Program <i>one step</i> RT-PCR dengan primer spesifik CD45.....  | 43 |
| Tabel 3.5 | <i>Master mix</i> PCR dengan primer spesifik Fc $\gamma$ RIIa .....  | 44 |
| Tabel 3.6 | Program PCR dengan primer spesifik Fc $\gamma$ RIIa. ....  | 45 |

## DAFTAR GAMBAR

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Gambar 2.1  | Pembelahan dan differensiasi <i>stem cell</i> .....   | 5  |
| Gambar 2.2  | Isolasi dan kultur <i>human ESC</i> dari <i>blastocysts</i> .....   | 8  |
| Gambar 2.3  | Differensiasi MSC .....   | 11 |
| Gambar 2.4  | Morfologi MSC dalam kultur.....   | 11 |
| Gambar 2.5  | Siklus pembelahan sel.....  | 14 |
| Gambar 2.6  | Fc region.....  | 16 |
| Gambar 2.7  | Fc <i>receptor</i> .....  | 16 |
| Gambar 2.8  | <i>Human Fc gamma receptors</i> .....   | 18 |
| Gambar 2.9  | Mekanisme antigen-antibodi melalui Fc <i>receptor</i> yang menyebabkan terjadinya inflamasi .....   | 19 |
| Gambar 2.10 | Pengikatan antibodi yang telah terkonjugasi zat <i>fluorescent</i> pada antigen permukaan suatu sel.....  | 22 |
| Gambar 2.11 | <i>Flow cytometry</i> secara skematik.....  | 22 |
| Gambar 2.12 | <i>Forward scatter and side scatter</i> .....   | 23 |
| Gambar 2.13 | Hasil analisa dengan <i>flow cytometry</i> ditampilkan dalam bentuk histogram.....  | 23 |
| Gambar 2.14 | Hasil analisa FSC/SSC darah lengkap dengan <i>flow cytometry</i> ditampilkan dalam bentuk dot plot .....  | 24 |
| Gambar 2.15 | Hasil analisa ekspresi CD45 darah lengkap yang dikonjugasi dengan <i>phycoerythrin</i> (PE) dengan <i>flow cytometry</i> ditampilkan dalam bentuk dot plot..... | 24 |
| Gambar 2.16 | Amplifikasi pada PCR yang terjadi secara eksponensial .....   | 28 |
| Gambar 2.17 | Siklus PCR .....  | 28 |
| Gambar 2.18 | Transkripsi dan translasi .....   | 29 |
| Gambar 4.1  | Hasil kultur <i>mesenchymal stem cell</i> selama 14 hari dengan perbesaran 400X .....   | 47 |
| Gambar 4.2  | Molekul FITC .....  | 48 |
| Gambar 4.3  | Visualisasi hasil <i>one step RT-PCR</i> pada <i>gel agarosa 2.5%</i> .....   | 50 |
| Gambar 4.4  | Struktur $\beta$ - <i>actin</i> .....   | 51 |
| Gambar 4.5  | Visualisasi hasil PCR pada <i>gel agarosa 2.5 %</i> .....   | 52 |

## **DAFTAR GRAFIK**

- Grafik 4.1 Hasil analisis dengan menggunakan *flowcytometry* menggambarkan populasi sel MSC hasil kultur (CD45<sup>-</sup>). Sel mononuklear yang berasal dari darah perifer/ PBMC (CD45<sup>+</sup>) digunakan sebagai kontrol positif. *Isotype control* digunakan sebagai *base line* ..... 49

## **DAFTAR LAMPIRAN**

|                         |    |
|-------------------------|----|
| Lampiran Foto Alat..... | 60 |
|-------------------------|----|