



## Gangguan Fungsi Sitoskeleton Pada Proses Vitrifikasi Keratinosit Primer Manusia

### *Malfunctioning of Cytoskeleton In Human primary Keratinosit Vitrification Process*

Indra Kusuma<sup>1</sup>, Restu Syamsul hadi<sup>2</sup>, Yurika Sandra<sup>3</sup>, Linda Dwijayanti<sup>4</sup>, Ratih Rinendyaputri<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, YARSI University

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Faculty of Medicine, YARSI University

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, YARSI University

<sup>4</sup>Department of Skin, Faculty of Medicine, University of Tarumanegara

<sup>5</sup>Health Research and Development Agency, Ministry Health of Indonesia

KATA KUNCI  
KEYWORDS

*Keratinosit, Sitoskeleton, Vitrifikasi, Kriopreservasi*  
*Keratinocytes, Cytoskeleton, Vitrification, Cryopreservation*

ABSTRAK

*Keratinosit basal memiliki sifat multipoten, dibutuhkan kultur bebas-serum agar terhindar dari diferensiasi spontan. Kultur keratinosit memberikan peluang untuk berbagai jenis aplikasi riset dan terapi seperti bioengineered skin. Penggunaan vitrifikasi pada penyimpanan keratinosit diharapkan dapat melindungi fungsi sel. Sampel kulit diperoleh dari preputium anak usia 4-9 tahun sebanyak 7 orang yang diperoleh dengan informed consent dari orang tua atau wali. Isolasi keratinosit menggunakan metode enzimatik dengan dispase dan trypsin/EDTA. Viabilitas dan proliferasi sel di ukur secara kalorimetrik dengan reagen WST-1 pada panjang gelombang 450 nm dan tehnik tryphan blue exclusion test. Data yang diperoleh diolah secara statistik dengan uji student t-test. Kriopreservasi dengan tehnik vitrifikasi dapat mempertahankan viabilitas pasca thawing sebesar 80% tidak ada perbedaan bermakna dengan tehnik slow-freezing ( $p>0,05$ ). Meski demikian hanya 30% dari sel tersebut dapat melakukan perlekatan. Hal ini jauh lebih rendah daripada tehnik slow-freezing yang dapat melakukan perlekatan hingga 70% ( $p<0,05$ ). Fotomikrografi yang diambil pasca thawing menunjukkan keratinosit yang mengalami blebbing. Disfungsi sitoskeleton akibat syok hiperosmotik dapat menyebabkan cell blebbing. Pembekuan sel dengan metode vitrifikasi mempengaruhi viabilitas, perlekatan dan kemampuan proliferasi sel dalam kultur. Syok hiperosmotik diperkirakan menyebabkan disfungsi sitoskeleton sehingga menjadi penyebab rendahnya kemampuan perlekatan dan hilangnya daya proliferasi pasca thawing pada vitrifikasi keratinosit.*

## ABSTRACT

*Basal keratinocytes retained a multipotency capacity which required a serum-free system to avoid spontaneous differentiation during expansion culture. Keratinocytes isolation and culture enable research and therapeutical exploration of bioengineered skin comprised of an epidermal and dermal layer. Vitrification method for cryopreservation expected to protect keratinocytes viability and function in a serum-free condition. Foreskin sample of 7 school-age children undergone the khitan procedure were collected with informed consent provided by their parents. Keratinocytes isolation used a combined enzymatic approach using dispase and trypsin/EDTA. Viability and cellular proliferation measured using tryphan blue exclusion method and WST-1 reagent at 450 nm respectively. Resulting data were analyze using student t-test in Microsoft Excel 2015. Cryopreservation using vitrification method result in 80% post thaw viability without significance difference ( $p>0.05$ ) with standard slow-freezing method with serum as one of the cryomedium component. However, only 30% of those cells retained the ability to grow attachment to plastic culture vessel. This result was significantly different with those preserve using the standard slow-freezing method with atttachment measured at 70% ( $p<0.05$ ). Post-thaw fotomicrograph shows that some cells have a blebbing morphology which indicate a cytoskeletal disfunction commonly caused by hyperosmotic shock. Cellular preservation using vitrification method caused changes in viability, attachment and cellular proliferation capacity. Hyperosmotic shock was considered to be the caused of cytoskeletal disfunction that leads to decrease in post-thaw cellular attachment dan proliferatioe capacity of vitrified keratinocytes.*

## PENDAHULUAN

Keratinosit adalah komponen epidermal utama pada kulit. Basal keratinosit berperan sebagai sel punca yang secara teratur mengalami diferensiasi dan migrasi ke lapisan lebih luar. Keratinosit berdiferensiasi membentuk lapisan keratin yang kedap air, fitur yang melindungi tubuh dari ancaman kehilangan cairan dan infeksi. Basal keratinosit diketahui memiliki sifat multipotensial karena dapat berdiferensiasi menjadi sel lain seperti sel saraf.(Grinnell and Bickenbach 2007)

Sel punca keratinosit dapat diisolasi dari preputium yang banyak dihasilkan dari proses khitanan.

Kewajiban khitanan pada masyarakat muslim di Indonesia memungkinkan suplai tak terbatas dari keratinosit untuk kebutuhan terapi. Pada umumnya preputium tersebut dibuang atau pada sebagian kecil masyarakat dibawa pulang untuk dikuburkan. Isolasi keratinosit dapat dilakukan segera setelah operasi, ekspansi kultur ditujukan untuk mendapatkan sebanyak mungkin sel sebelum penggunaan lebih lanjut

## Correspondence:

Indra Kusuma, Department of Physiology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta  
Email: indra.kusuma@yarsi.ac.id

Terapi sel dengan keratinosit dapat menggunakan suspensi sel langsung, atau digunakan bersama komponen dermis membentuk *Bioengineered Skin*. Keratinosit hasil isolasi dapat disimpan-beku untuk penggunaan sewaktu-waktu. Secara umum ada 2 metode kriopreservasi yaitu kriopreservasi konvensional dan vitrifikasi. Pada kriopreservasi konvensional kecepatan pembekuan diatur menggunakan alat pembekuan terprogram (*programmable freezing machine*). Kekurangan penggunaan alat tersebut adalah harga yang mahal dan tidak praktis untuk aplikasi. Selain itu pada pembekuan lambat memungkinkan terbentuknya kristal es yang dapat mengakibatkan kerusakan dan berujung pada kematian sel.

Pada vitrifikasi pembentukan kristal es tidak terbentuk karena proses pembekuan dilakukan sangat cepat. Hal tersebut menyebabkan cairan di dalam dan luar sel menjadi *glassy (glass-like/vitreous)*. (Selman 2005) Saat ini metode vitrifikasi menjadi alternatif yang lebih mudah, murah, efisien, cepat dan sederhana pada kriopreservasi berbagai sel.

### Vitrifikasi

Simpan beku (kriopreservasi) dapat didefinisikan sebagai sebuah metode untuk menyimpan sel dalam keadaan inaktif, dengan cara melakukan pendinginan hingga mencapai suhu di bawah 0°C (*subzero*), sehingga dapat digunakan atau direaktivasi di kemudian hari dengan cara melakukan pencairan (*thawing*). Suhu ideal untuk menyimpan sel dalam waktu yang lama adalah -196°C (dalam nitrogen cair). (Djuwantono et al. 2011). Metode yang umum digunakan adalah pembekuan lambat

dengan laju penurunan suhu 1°C/menit. Metode tersebut membutuhkan tahap pembekuan pada -80°C selama *overnight* sebelum masuk ke nitrogen cair keesokan harinya (Freshney). Masalah utama pada metode kriopreservasi adalah terbentuknya kristal es dan *osmotic shock* yang menyebabkan kerusakan dan kematian sel.

Pada kriopreservasi konvensional kecepatan pembekuan diatur menggunakan metode *temperature-controlled slow-freezing*. Kekurangan penggunaan alat tersebut adalah harga yang mahal dan tidak praktis untuk aplikasi. Selain itu pada pembekuan lambat memungkinkan terbentuknya kristal es. Pembentukan kristal es dapat terjadi pada berbagai suhu rendah dari 0 sampai -35°C Kristal es inilah yang dapat mengakibatkan kerusakan dan berujung pada kematian sel.

Pada vitrifikasi pembentukan kristal es tidak terbentuk karena proses pembekuan dilakukan sangat cepat dan menggunakan krioprotektan konsentrasi tinggi. Hal tersebut menyebabkan cairan di dalam dan luar sel menjadi *glassy (glass-like/vitreous)* (Selman 2005). Selain dapat mengeliminasi pembentukan kristal es, pembekuan yang cepat dapat mengurangi toksisitas krioprotektan. Krioprotektan akan langsung membeku sehingga sel tidak terpapar lama oleh krioprotektan. (Reubinoff et al. 2001) Namun penggunaan krioprotektan dalam konsentrasi tinggi mengakibatkan syok osmotik yang merusak sel. Hal inilah yang menyebabkan kematian sel saat menggunakan metode vitrifikasi dan keberhasilannya juga bergantung pada ketrampilan dan kesiapan operator.

Meskipun demikian saat ini metode vitrifikasi menjadi alternatif yang lebih mudah, murah, efisien, cepat dan sederhana pada kriopreservasi berbagai jenis sel.

Vitrifikasi adalah metode yang telah sukses digunakan pada embrio, *inner cell mass* (ICM), sel punca embrional dan spermatozoa. (Isachenko et al. 2004a, 2004b; Ström et al. 2010; Desai et al. 2011) Sel punca mesenkimal asal darah tali pusat yang disimpan dengan metode vitirifikasi menunjukkan viabilitas yang rendah. (Balci and Can 2013) meski demikian vitrifikasi rutin digunakan oleh praktisi fertilisasi in vitro untuk pembekuan embrio pada berbagai tahap perkembangan. Penggunaan vitrifikasi pada keratinosit sejauh yang diketahui peneliti belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi kemungkinan penyimpanan keratinosit menggunakan tehnik vitrifikasi.

### CARA KERJA

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan sampel berupa sel dengan perlakuan simpan-beku metode vitrifikasi. Desain penelitian ini menggunakan 2 kelompok yaitu kelompok dengan perlakuan simpan-beku metode vitrifikasi dan tanpa perlakuan yaitu kultur ekspansi tanpa melewati simpan-beku. Sampel berupa sel yang berasal dari manusia diperoleh dengan *informed consent* dari pasien, keluarga atau yang mewakili. Kedua kelompok menggunakan metode kultur bebas-serum dengan medium Epilife (Gibco) dan suplementasi HKGS (Gibco), ITS (Sigma) dan antibiotic-antimikotik (Sigma) masing-masing 1%. Jumlah pasasi serta jumlah sel per tanam

ditetapkan berdasarkan protokol sebelumnya (Kusuma dan Hadi, 2013) sebesar 20.000 sel per cawan kultur dengan 2 kali pengulangan (duplo).

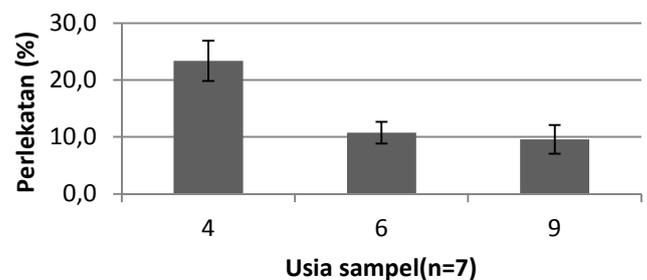
Parameter yang di ukur adalah viabilitas sel dihitung berdasarkan metode *tryphan-blue exclusion* berupa rasio antara sel hidup dengan total sel. Pola pertumbuhan sel di lihat berdasarkan deskripsi kurva pertumbuhan harian sel yang meliputi fase lag, fase logaritmik dan fase stasioner. Data viabilitas diperoleh menggunakan kamar hitung nebauer dan mikroskop cahaya standar. Kurva pertumbuhan diplot berdasarkan data viabilitas harian dalam seminggu kultur.

Data viabilitas dibandingkan antara rerata viabilitas kelompok kontrol yang diperoleh dari pasasi rutin dengan data rerata viabilitas kelompok perlakuan pada pasasi rutin setelah mengalami perlakuan selama 3 hari. Kurva pertumbuhan selama seminggu dibandingkan secara deskriptif. Perbedaan yang ditemukan diuji dengan statistik paired student t-test pada perangkat lunak Microsoft Excell 2007.

### HASIL

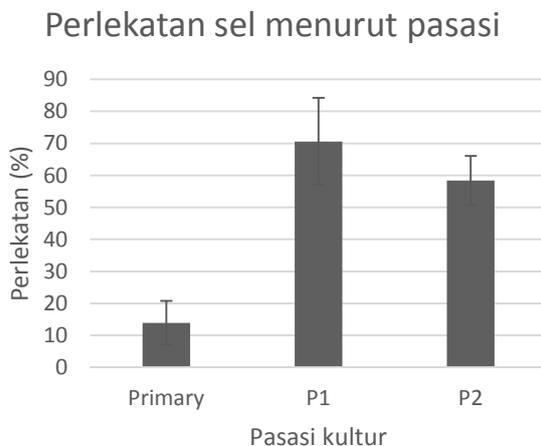
#### Kultur Keratinosit

##### Perlekatan sel menurut usia



**Gambar 1. Prosentase perlekatan keratinosit primer berdasarkan usia**

Pada gambar 1 tampak perbedaan kemampuan perlekatan isolat keratinosit primer berdasarkan usia sampel. Sel yang berasal dari sampel berusia 4 tahun memiliki efisiensi perlekatan lebih baik yaitu lebih dari 20% sel yang ditanam dapat melekat pada wadah kultur. Perbedaan efisiensi perlekatan juga terlihat berbeda pada generasi berikutnya (gambar 2) yaitu sel hasil pasasi 1(P1) dan pasasi 2 (P2). Penanaman lebih efisien terlihat pada P1 dan P2 mencapai 60-70 %. Pada P1 dan P2 hanya sel yang berasal dari sampel berusia 4 dan 6 tahun yang dapat terus hidup hal ini terlihat pada kurva pertumbuhan yang mampu memasuki fase proliferasi khususnya pada sel yang berasal dari usia 4 tahun. (gambar 3).

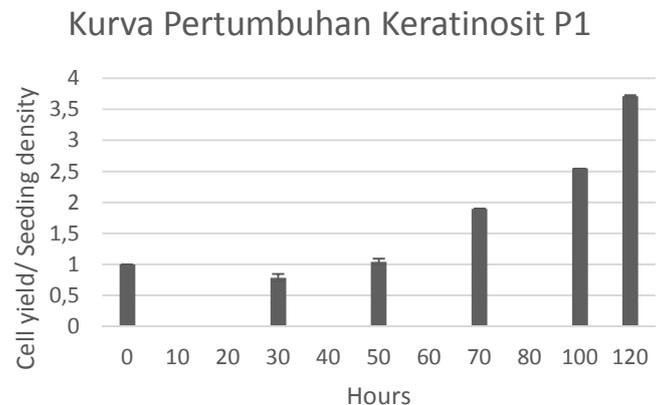


**Gambar 2. Efisiensi perlekatan berdasarkan pasasi**



**Gambar 3. Kurva Pertumbuhan HEK Primer (P0)**

Kurva pertumbuhan keratinosit P0 dan P1 (gambar 3 dan 4) menunjukkan menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel hidup pada 48 jam pertama, sementara fase proliferasi terjadi setelah hari ketiga kultur (Day in Vitro/DIV3).



**Gambar 4. Kurva pertumbuhan keratinosit P1**

**Studi Kriopreservasi**

Studi pembekuan sel dilakukan menggunakan metode *slow-freeze* dan vitrifikasi. Teknik *slow-freeze* menggunakan pembekuan bertahap dengan bantuan isopropanol pada suhu -80°C selama 18 jam sebelum masuk nitrogen cair keesokan harinya. Krioprotektan yang digunakan adalah medium kultur, serum dan Me2SO (7:2:1). Vitrifikasi dilakukan secara bertahap dengan larutan ekuilibrisasi (V1) dan vitrifikasi (V2), komposisi V1 dan V2 dirinci pada table 1. Pellet sel yang diperoleh ditambahkan 50 uL larutan V1 dan inkubasi pada suhu ruangan selama 10 menit sebelum ditambahkan 500 uL larutan V2 selama 60 detik dan langsung dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Pada setiap eksperimen digunakan sebanyak 1 juta viable sel.

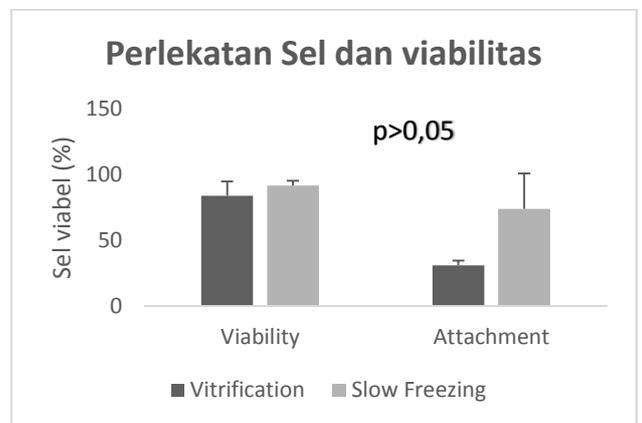
Tabel 1. Komposisi larutan untuk vitrifikasi

Jenis Larutan	Sucrose	FBS	Etilen Glikol	DMSO	PBS
V1		V	V		V
V2	V	V	V	V	V
V3	V	V			V
V4		V			V

Setelah 24 jam dalam nitrogen cair sampel di hangatkan dalam air bersuhu 37°C. Sampel sel yang mendapat perlakuan teknik *slow-freeze* dihangatkan dengan mencampurkan 9 ml medium kultur yang telah dihangatkan sebelumnya. Sampel yang mendapat perlakuan vitrifikasi dihangatkan hingga mencair pada air

bersuhu 37°C dan kemudian dilakukan dilusi bertahap sebanyak 2 kali dengan larutan V3 dan V4 dengan 2 menit inkubasi pada setiap tahap.

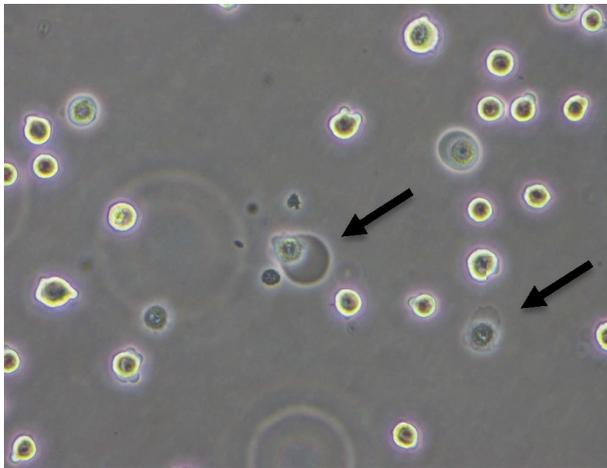
Sampel diambil untuk pemeriksaan viabilitas dengan tryphan blue dan sisa sel di sentrifuge pada 1500 rpm selama 10 menit untuk kemudian di tanam. Perbandingan viabilitas pasca pembekuan dapat dilihat pada gambar 5. Kedua tehnik dapat melindungi viabilitas hingga lebih dari 80% sel yang disimpan. Meski demikian viabilitas sel belum menggambarkan kemampuan fungsional sel untuk dapat melekat pada wadah kultur dan mengambil morfologi khasnya. Pada gambar 5 terlihat efisiensi perlekatan sel yang dibekukan dengan tehnik vitrifikasi hanya berkisar pada 30 % lebih rendah daripada sel yang dibekukan dengan tehnik *slow-freeze* yang dapat mencapai 70 %.



**Gambar 5. Perbandingan perlekatan dan viabilitas pasca pembekuan**

Perbedaan viabilitas dan kemampuan perlekatan ini menunjukkan bahwa terdapat suatu proses yang menyebabkan gangguan fungsi sel. Gangguan fungsi yang dialami oleh keratinosit yang di bekukan dengan tehnik vitrifikasi juga

menyebabkan sel tidak dapat melakukan mitosis untuk berproliferasi. Gambar 6 menunjukkan terjadinya *cell blebbing* pada sel pasca *thawing*.



Gambar 6. Cell Blebbing (panah)

## DISKUSI

Keratinosit di kenal sebagai salah satu jenis sel yang sulit di kultur. Kultur dengan menggunakan serum menyebabkan keratinosit cepat berdiferensiasi menjadi keratinosit suprabasal dan kehilangan kemampuan berproliferasi. Hasil yang kami dapatkan pada gambar.1 mengkonfirmasi bahwa sel yang diperoleh dari sampel berusia lebih muda akan lebih mudah di kultur. Hal ini sejalan dengan prinsip bahwa sel yang berusia muda memiliki telomere yang lebih panjang dari pada sel yang berusia lebih tua. Secara alami juga keratinosit pada kulit memiliki usia yang pendek dan diganti secara terus menerus.

Kultur secara *in vitro* di atas cawan plastik akan menyebabkan seleksi pada keratinosit yang mampu beradaptasi pada plastik (gambar 2). Secara alami keratinosit basal berdiri di atas lapisan kolagen tipe IV yaitu membrane basalis. Sehingga,

subpopulasi keratinosit yang dapat beradaptasi pada plastik diperkirakan terdiri dari sel punca atau sel progenitor. Sel punca akan mengalami diferensiasi spontan ketika di kultur bersama serum, seperti yang terjadi pada keratinosit. Kultur keratinosit secara bebas-serum ternyata dapat diarahkan untuk berdiferensiasi menjadi sel saraf. (Grinnel dan Birkenbach, 2007)

Keratinosit pada penelitian dapat dikultur dengan baik yang diperlihatkan pada kurva pertumbuhan (gambar 3 dan 4) memiliki fase lag dan fase log seperti yang dideskripsikan oleh Freshney. Terlihat perbedaan lamanya fase lag antara sel primer dan sel pasasi 1. Fase lag pada gambar 4 berlangsung sekitar 50 jam sementara pada gambar 3 fase lag terjadi hingga hari ke-6 kultur. Hal ini menunjukkan proses seleksi dan adaptasi yang terjadi pada kultur sel primer.

Kriopreservasi menggunakan tehnik vitrifikasi pada keratinosit menggunakan kriomedium seperti pada tabel 1 pada penelitian ini menyebabkan gangguan fungsi berupa hambatan kemampuan perlekatan dan proliferasi. Penggunaan kriomedium dengan konsentrasi tinggi pada proses vitrifikasi memang berisiko menimbulkan syok hiperosmotik yang berakibat kematian sel. (Selman, 2005) Meski demikian pada penelitian ini viabilitas sel pasca *thawing* tidak berbeda secara bermakna ( $p>0,05$ ) dengan viabilitas keratinosit yang dibekukan dengan tehnik *slow-freezing*.

Gangguan fungsi sitoskeleton diperkirakan menjadi penyebab terjadinya hambatan perlekatan dan proliferasi. Reorganisasi sitoskeleton diperlukan dalam proses migrasi dan mitosis. Hal ini diperkuat dengan

ditemukannya gambran *cell blebbing* pada pasca *thawing* keratinosit yang dibekukan dengan vitrifikasi. (gambar 6) *Blebbing* adalah keadaan ketika membrane sel terlepas dari jejaring sitoskeleton yang menunjangnya, hal ini dapat terjadi pada proses migrasi, mitosis, *abrupt detachment*, apoptosis dan syok hiperosmotik. (Coleman et al. 2001; Norman et al. 2010)

### SIMPULAN DAN SARAN

Pembekuan keratinosit dengan metode vitrifikasi mempengaruhi viabilitas, perlekatan dan kemampuan proliferasi sel dalam kultur. Adaptasi vitrifikasi sebagai prosedur rutin kriopreservasi keratinosit membutuhkan peningkatan kemampuan teknis spesifik untuk proses vitrifikasi dan secara umum pengetahuan di bidang kriobiologi mengenai berbagai pengaruh krioprotektan terhadap keseimbangan fungsi membran sel.

### Ucapan Terima Kasih

Yayasan YARSI yang telah memberikan dana untuk penelitian ini, dr Rika Yuliwulandari, Ph.D. yang memberikan kesempatan bekerja di laboratorium terpadu Universitas YARSI, dr Mahdian Nasution Sp.BS yang telah membantu pengambilan sample kulit.

### KEPUSTAKAAN

Balci D, Can A. The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells towards a Potential Use for Stem Cell Banking. *Current stem cell research & therapy*. Bentham Science Publishers; 2013;8(1):60-72.

Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology*. Nature Publishing Group; 2001;3(4):339-45.

Desai N, Xu J, Tsulalia T, Szeptycki-Lawson J, AbdelHafez F, Goldfarb J, et al. Vitrification of mouse embryo-derived ICM cells: a tool for preserving embryonic stem cell potential? *Journal of assisted reproduction and genetics*. Springer; 2011;28(2):93-9.

Djuwantono T, Wirakusumah FF, Achmad TH, Sandra F, Halim D, Faried A. A comparison of cryopreservation methods: Slow-cooling vs. rapid-cooling based on cell viability, oxidative stress, apoptosis, and CD34+ enumeration of human umbilical cord blood mononucleated cells. *BMC research notes*. BioMed Central Ltd; 2011;4(1):371.

Freshney RI. *Culture of animal cells, a manual of basic technique*. John Wiley and Sons, inc;

Grinnell K, Bickenbach J. Skin keratinocytes pre-treated with embryonic stem cell-conditioned medium or BMP4 can be directed to an alternative cell lineage. *Cell proliferation*. Wiley Online Library; 2007;40(5):685-705.

Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction*. ESHRE; 2004 a;19(4):932-9.

Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of reproduction*. Soc Study Reprod; 2004 b;71(4):1167-73.

- Kusuma I, Hadi RS. Geraniin supplementation increases human keratinocyte proliferation in serum-free culture. *Universa Medicina*. 2013;32(1):3-10.
- Norman LL, Bruges J, Sengupta K, Sens P, Aranda-Espinoza H. Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells. *Biophysical journal*. Elsevier; 2010;99(6):1726-33.
- Reubinoff B, Pera M, Vajta G, Trounson A. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Human Reproduction*. ESHRE; 2001;16(10):2187-94.
- Selman H. Vitrification versus conventional cryopreservation technique. *Middle East Fertility Society Journal*. 2005;10(3).
- Ström S, Holm F, Bergström R, Strömberg A-M, Hovatta O. Derivation of 30 human embryonic stem cell lines – improving the quality. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. Springer; 2010;46(3-4):337-44.