

## **Pengaruh Glukosa Tinggi terhadap Proliferasi, Migrasi dan Ekspresi Gen OCT-4 pada Kultur Sel Dermal Fibroblast Manusia**

### ***The Effects of High Glucose on Proliferation, Migration and Expression of OCT-4 in Human Dermal Fibroblast Cell Culture***

Restu Syamsul Hadi<sup>1</sup>, Yurika Sandra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology-Anatomy, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

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

Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta 10510

Telephone (021) 4206674, 4206675, 4206676

Corresponden: restuhadi@gmail.com

#### **Abstrak**

*Human dermal fibroblasts (HDF)* termasuk sel *mesenchymal* yang diisolasi dari lapisan dermis kulit. HDF berpotensi digunakan untuk pengobatan penyembuhan luka berdasarkan pengobatan regeneratif. Peningkatan konsentrasi glukosa dapat merusak fungsi sel dan menghambat terapi penyembuhan luka. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh glukosa tinggi pada proliferasi, migrasi dan ekspresi gen OCT-4 sel HDF sebagai model penyembuhan luka diabetes *in vitro*. Pada penelitian eksperimental ini, fibroblast diisolasi dari kulit setelah sirkumsisi, kemudian ditumbuhkan dalam medium *Minimal Essential Medium (DMEM)* Dulbecco lengkap dengan serum 10%. Untuk menguji efek glukosa tinggi pada proliferasi sel HDF dilakukan dengan uji CCK-8. Migrasi sel HDF dievaluasi menggunakan uji *scratch-assay*. RT-PCR digunakan untuk menentukan ekspresi gen OCT-4. Hasilnya menunjukkan bahwa glukosa tinggi (25 mM-50 mM) meningkatkan kemampuan proliferasi dan migrasi sel HDF. Efek glukosa tinggi tergantung pada dosis. Perlakuan glukosa pada dosis 75 mM akan menghambat kemampuan pertumbuhan HDF. Ekspresi gen OCT-4 meningkat secara bermakna pada pemberian glukosa dosis 25-50 mM. Hasil penelitian ini memberikan dasar untuk pengembangan terapi dalam kondisi diabetes bahwa terapi sel HDF dapat meningkatkan penyembuhan luka meskipun dalam kondisi glukosa tinggi.

**Kata kunci:** fibroblast kulit manusia; glukosa tinggi; proliferasi; migrasi; ekspresi gen OCT

#### **Abstract**

*Human dermal fibroblasts (HDF)* are *mesenchymal cells* isolated from the dermis layer of the skin. HDF has the potential to be used for the treatment of wound healing based on regenerative medicine. Elevated glucose concentrations may harm function and inhibit wound healing therapy. This study was conducted to examine the effect of high glucose on proliferation, migration of HDF cell and OCT-4 gene expression as a model of diabetic wound healing *in vitro*. In this experimental study, fibroblasts were isolated from foreskin then grown in medium Dulbecco's Minimal Essential Medium

(DMEM) complete with 10% serum. To test the effect of high glucose on HDF cell proliferation, the CCK-8 kit was performed. HDF cell migration was evaluated using the scratch assay test. RT-PCR is used to determine OCT-4 gene expression. The results show that high glucose (25 mM-50 mM) increases the ability of HDF cell proliferation and migration. The effect of high glucose is dose-dependent, glucose treatment at a dose of 75 mM will inhibit the growth of HDF. The expression of OCT-4 genes was significantly increased at 25-50 mM doses of glucose. The results of this study provide the basis for the development of therapy in diabetic conditions that HDF cell therapy can improve wound healing even in high glucose conditions.

**Keywords:** human dermal fibroblast; high glucose; proliferation; migration; OCT gene expression

## Pendahuluan

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu masalah utama dalam sistem kesehatan dan ancaman kesehatan masyarakat global yang telah meningkat secara dramatis selama 2 dekade terakhir. Menurut studi epidemiologi, jumlah pasien dengan DM meningkat dari sekitar 30 juta kasus pada tahun 1985, 177 juta pada tahun 2000, 285 juta pada 2010 dan diperkirakan terus meningkat. lebih dari 360 juta orang pada tahun 2030 (Yazdanpanah *et al.*, 2015).

Kadar glukosa darah yang tinggi secara berkepanjangan akan menimbulkan penyulit pada berbagai organ tubuh seperti stroke akibat kerusakan pembuluh darah otak, kebutaan akibat kerusakan pembuluh darah mata, penyakit jantung koroner akibat kerusakan pembuluh darah koroner, penyakit ginjal kronik akibat kerusakan pembuluh darah ginjal dan ulkus diabetik akibat kerusakan pembuluh darah kaki (Waspadji, 2002). Komplikasi diabetes yaitu ulkus diabetik menyebabkan 1 juta amputasi per tahun sehingga pada tahun 2011 diperkirakan terjadi amputasi akibat ulkus diabetik setiap 20 detik di seluruh dunia. Diabetes juga menyebabkan peningkatan angka kesakitan oleh tuberkulosis dan tingginya risiko kegagalan

pengobatan bahkan kematian dibanding orang yang tidak memiliki diabetes (IDF, 2011).

Ulkus diabetes merupakan salah satu komplikasi penyakit diabetes yang menjadi salah satu masalah yang sering timbul pada penderita diabetes. Ulkus diabetes menjadi masalah di bidang sosial dan ekonomi yang mempengaruhi kualitas hidup penderitanya. Masalah pada kaki diabetik misalnya ulserasi, infeksi, dan gangren, merupakan penyebab umum perawatan di rumah sakit bagi para penderita diabetes. Perawatan rutin ulkus, pengobatan infeksi, amputasi dan perawatan di rumah sakit membutuhkan biaya yang sangat besar tiap tahun dan menjadi beban yang sangat besar dalam sistem pemeliharaan kesehatan. Pengeluaran yang dihabiskan untuk diabetes mencapai 11% dari keseluruhan anggaran kesehatan. Rerata individu dengan diabetes mengeluarkan USD 1274 pada 2011 tidak termasuk biaya tidak langsung akibat hilangnya produktivitas dan perawatan (IDF, 2011).

Penanganan ulkus diabetes terdiri dari penentuan dan perbaikan penyakit dasar penyebab ulkus, perawatan luka yang baik, dan pencegahan kekambuhan ulkus. Penyebab ulkus diabetes dapat ditentukan secara tepat melalui anamnesis dan pemeriksaan fisik yang

cermat. Ulkus diabetes mempunyai kecenderungan terjadi pada beberapa daerah yang menjadi tumpuan beban terbesar, seperti tumit, area kaput metatarsal di telapak, ujung jari yang menonjol terutama pada jari pertama dan kedua.

Kadar glukosa yang tinggi (hiperglikemi) pada penderita ulkus diabetik akan memperlambat proses penyembuhan luka. Kondisi ini juga menyebabkan kegagalan pengobatan yang dapat berakibat pada amputasi. Upaya penyembuhan dengan terobosan terkini menggunakan *stem cell* terus dilakukan. Untuk itu perlu lebih memahami mekanisme yang terkait dengan kondisi hiperglikemi pada saat terapi, termasuk apabila dilakukan dengan pemberian *stem cell*. Apakah dalam kondisi hiperglikemi *stem cell* masih memiliki potensi diferensiasi dan terjaga *stemnessnya*? Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk mengkaji pengaruh glukosa tinggi pada proliferasi, migrasi dan ekspresi gen OCT-4 sel *human dermal fibroblast* sebagai model penyembuhan luka diabetes in vitro

## Bahan dan Metoda Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental secara in vitro. Sampel yang digunakan adalah sel *Human Dermal Fibroblast* (HDF) yang berasal dari *biorepository* Universitas YARSI. Kultur sel HDF ditanam dalam medium *Dulbeco's Minimal Essential Medium* (DMEM) dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% dan antibiotik-antimikotik ditanam dalam cawan kultur 96 sumuran dan 24 sumuran tergantung keperluan ujinya. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37 °C sebanyak 10.000 sel/cm<sup>2</sup>. Masing-masing dibagi dalam 6 kelompok perlakuan dengan ulangan *triplicate* yaitu: Kelompok 1. Kontrol

DMEM-Non Serum (NS), Kelompok 2. Kontrol DMEM-*Low Glucose* (LG), Kelompok 3. DMEM-*High Glucose* dosis 25 mM (HG25), Kelompok 4. DMEM-*High Glucose* dosis 30 mM (HG30), Kelompok 5. DMEM-*High Glucose* dosis 50 mM (HG50), Kelompok 6. DMEM-*High Glucose* dosis 75 mM (HG75).

## Uji Proliferasi Sel dengan CCK-8

Setelah 24 jam inkubasi dilanjutkan dengan pengukuran parameter penelitian. Untuk membaca kemampuan proliferasi sel setelah pemberian CCK-8 (Sigma). Setelah 24 jam perlakuan, medium dibuang dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali. Selanjutnya ditambahkan 90 ul PBS dan 10 ul CCK-8, diinkubasi selama 90 menit. Selanjutnya sel dalam cawan kultur 96 sumuran diperiksa menggunakan *microplate reader* untuk dibaca *optical density* (OD) pada panjang gelombang 450 nm.

## Uji Migrasi

Sel HDF ditanam dalam *multi well plate* 24 well, masing-masing *well* berisi 20.000 sel/*well*. Setelah konfluen dilakukan *scratch* dengan ujung tip 100 ul. Kemudian dibilas dengan menggunakan PBS lalu diberi perlakuan dengan variasi konsentrasi kadar glukosa dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu diukur pertumbuhan sel yang mengisi area bekas *scratch*. Untuk mengetahui kemampuan migrasi dilakukan *scratch assay* dan dihitung luas area pengisian sel dari setiap kelompok perlakuan.

## Uji ekspresi gen OCT-4

Sebanyak 1 juta sel HDF tiap kelompok perlakuan dengan berbagai kadar glukosa dilakukan isolasi RNA total menggunakan *RNA Isolation kit* (Qiagen). Total RNA dihitung dengan menggunakan Qubit Fluorometer (Invitrogen). *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan dengan

menggunakan *Lightcycler RNA Master SYBR Green I*. Primer forward dan reverse untuk OCT-4 adalah 5'-AGGTGTTTCAGCC AAACGACC-3' dan 5'-TGATCGTTTGGCC TTCTGGC-3'. Beta-Actin tadi digunakan sebagai *house keeping gene* dengan berikut urutan primer: forward 5'-AGAGCTACGA GCTGCCTGAC-3' dan reverse 5'-AGCAC TGTGTTGGCGTACAG-3'.

Profil ekspresi untuk transkripsi mRNA ditampilkan sebagai *cycle threshold (Ct)* relative terhadap Beta-Actin.

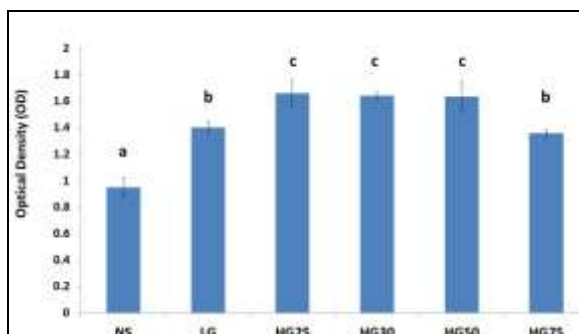
### Analisis Data

Semua data yang diperoleh kemudian dideskripsikan dengan mean  $\pm$  SD. Analisis perbedaan dengan Anova dilanjutkan dengan post hoc uji LSD pada tingkat kemaknaan  $< 0,05$  menggunakan SPSS.

## Hasil Penelitian

### 1. Kemampuan Proliferasi

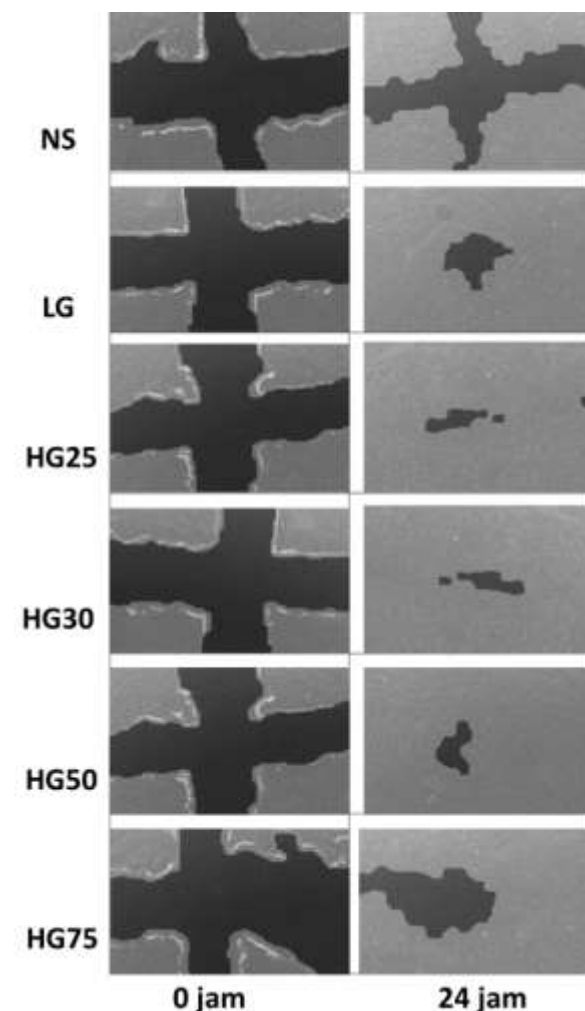
Uji proliferasi human dermal fibroblast pada berbagai perlakuan akibat pemberian glukosa tinggi menunjukkan adanya peningkatan proliferasi. Dosis glukosa 50 mM merupakan dosis maksimal dapat meningkatkan proliferasi, selanjutnya peningkatan dosis akan menurunkan.



Gambar 1. Pengaruh glukosa tinggi terhadap kemampuan Proliferasi HDF. Nilai OD pada panjang gelombang 450 nm.

Pada gambar 1 memperlihatkan bahwa pemberian glukosa diperlukan untuk proliferasi sel sampai pada batas tertentu. Kelompok kontrol tanpa serum (NS) menunjukkan proliferasi paling rendah. Ini memperlihatkan bahwa serum juga diperlukan untuk proliferasi sel. Kadar glukosa rendah (5 mM) sudah cukup untuk meningkatkan proliferasi dibandingkan kelompok tanpa serum. Demikian juga kadar glukosa tertinggi masih dapat meningkatkan proliferasi dibandingkan dengan kelompok tanpa serum.

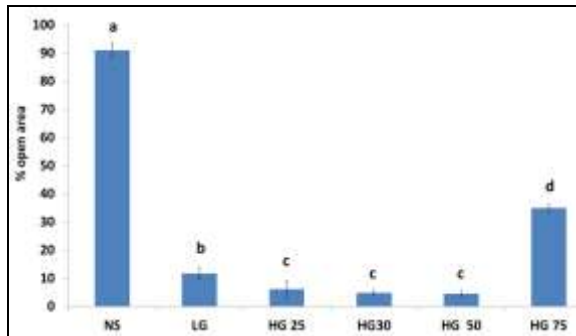
### 2. Migrasi sel



Gambar 2. Gambaran hasil uji scratch assay pada berbagai kelompok perlakuan.

Uji migrasi dimaksudkan untuk menilai kemampuan sel untuk menutup model luka yang

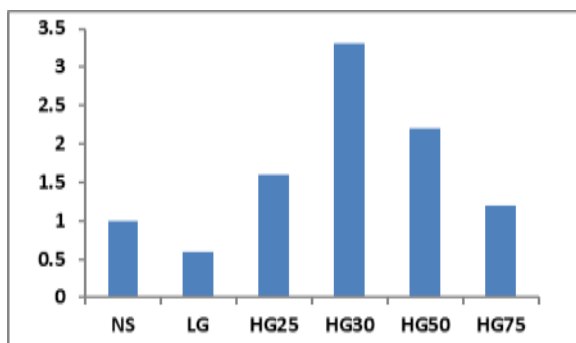
dilakukan dengan menorehkan ujung tip. Semakin kecil ruang warna hitam menunjukkan kecepatan migrasi sel pada penutupan model luka. Gambar 2 memperlihatkan kelompok perlakuan dosis glukosa 25 dan 30 mM paling cepat menutup area.



Gambar 3. Pengaruh HG terhadap migrasi sel HDF setelah 24 jam inkubasi. Open area (%) semakin kecil menunjukkan migrasi semakin cepat. Huruf beda menunjukkan beda nyata  $P < 0,05$

Uji migrasi sel HDF akibat pemberian glukosa tinggi (gambar 3) menunjukkan bahwa kadar glukosa maksimal yang dapat meningkatkan migrasi sel yaitu 50 mM dan kadar optimal 30 mM. Peningkatan kadar glukosa hingga 75 mM menghambat migrasi sel. Hambatan migrasi paling besar diperlihatkan pada kelompok NS. Hal ini menunjukkan bahwa serum diperlukan dalam proses migrasi sel. Demikian juga glukosa diperlukan untuk migrasi dengan dosis yang optimum.

### 3. Ekspresi gen OCT-4



Gambar 4. Pengaruh HG terhadap Ekspresi Gen OCT-4 pada sel HDF, nilai Ct relatif terhadap kontrol NS.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa human dermal fibroblas hasil isolasi sel primer memiliki ekspresi basal mRNA untuk gen OCT-4. Peningkatan ekspresi gen OCT-4 secara optimal pada kelompok dengan pemberian glukosa dosis 30 mM. Peningkatan dosis glukosa selanjutnya sebaliknya akan menghambat ekspresi gen OCT-4.

### Diskusi

Fibroblast dermal manusia (HFD) berperan dalam penyembuhan luka dengan cara berproliferasi ke dalam luka, sintesis komponen matriks ekstraseluler (ECM) dan remodeling bekas luka. Akumulasi dari ECM oleh fibroblas selama proses penyembuhan luka dapat disimpulkan sebagai keseimbangan antara akumulasi matriks dan degradasi. HDF mensintesis komponen ECM yaitu fibronectin dan asam hialuronat. Sintesis proteoglikan serta kolagen tipe I dan tipe III disimpan dan menjadi komponen utama dari ECM. Fibroblas juga mensintesis enzim proteolitik dan matriks metaloproteinase (MMPs yang mampu menurunkan semua komponen ECM (Zhang *et al.*, 2016).

Peran utama dari fibroblast dalam penyembuhan luka adalah untuk menggantikan fibrin matriks sementara selama fase inflamasi dengan jaringan granulasi yang kaya kolagen. Perilaku fibroblas pada luka sangat dinamis dan bervariasi pada setiap fase penyembuhan. Fibroblas mencapai luka selama hari kedua atau ketiga setelah cedera. Empat hari setelah cedera, fibroblast menjadi jenis sel utama dalam pembentukan jaringan granulasi. Jumlah fibroblast meningkat melalui migrasi dan proliferasi sel (Golberg *et al.*, 2013).

Penyembuhan luka dimulai dengan pembentukan bekuan darah oleh trombosit.

pengeluaran mediator inflamasi. dan infiltrasi neutrofil dan makrofag. Pada saat yang sama re-epitelisasi dimulai untuk menutup luka dan terakhir migrasi fibroblast (Metcalf & Ferguson, 2007). Fibroblas dermal memainkan peran penting selama penyembuhan luka kulit. Pada tahap awal penyembuhan luka, proliferasi dan migrasi fibroblas dermal diaktifkan, yang penting untuk kontraksi luka, deposisi matriks ekstraseluler, dan pembentukan kembali jaringan. Selain itu, perbaikan luka merupakan proses kompleks yang bergantung pada interaksi antara sel efektor dan sitokin, termasuk EGF, PDGF-AA, VEGF, dan bFGF (Zhao *et al.*, 2013).

Kadar glukosa tinggi antara 25 mM sampai 50 mM telah dilaporkan dapat menurunkan sintesis kolagen. Pada fibroblast asal gusi (*Human Gingival Fibroblasts*) tanpa mempengaruhi viabilitas sel atau sintesis protein. Demikian pula telah dilaporkan bahwa glukosa tingkat 30 dan 35 mM menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam apoptosis pada sel endotel (Baumgartner-Parzer, 1995).

Studi lain menyiratkan bahwa dibandingkan dengan sel yang lain, jenis sel fibroblas lebih tahan terhadap kadar glukosa tinggi. Sebuah studi terbaru melaporkan gangguan migrasi sel pada fibroblas gingiva tikus setelah paparan glukosa 75 mM selama 72 jam dan menunjukkan konsentrasi glukosa yang optimal untuk kultur *in vitro* dari fibroblas gingiva lebih tinggi dari konsentrasi optimal *in vivo* (Willershausen-Zonnchen, 1991).

Studi terbaru mengungkapkan bahwa kadar metaloprotease yang tinggi merupakan ciri penderita luka diabetes dan kadar MMP dalam cairan luka kronis hampir 60 kali lipat lebih tinggi dari luka akut. Peningkatan aktivitas protease ini mendukung kerusakan jaringan dan

menghambat proses perbaikan normal. Salah satu kemungkinan alasan di balik ini adalah konsentrasi glukosa yang tinggi secara langsung merubah kadar dan ekspresi MMP melalui efek pro-inflamasi dan sitokin pro-fibrotik akibat peningkatan aktivasi dan invasi inflamasi sel (Patel *et al.*, 2019).

OCT-4 telah terbukti perlu untuk mempertahankan pluripotensi sel punca embrionik. OCT-4 dianggap sebagai pengatur utama dari pluripotensi. Selain gen OCT-4 yang diaktifkan adalah gen Sox2 dan Nanog. Seiring dengan OCT-4, gen ini juga diperlukan untuk mempertahankan sel dalam keadaan kemampuan pluripoten (Racila *et al.*, 2011). Pada penelitian ini kadar glukosa tinggi dengan dosis 25-50 mM masih dapat mempertahankan pluripotensi dengan meningkatkan ekspresi gen OCT-4, selanjutnya akan menurun dengan peningkatan kadar glukosa tinggi 75 mM.

Dengan demikian meskipun pada model hiperglikemia pengaruh kadar glukosa tinggi masih dapat mempertahankan kemampuan proliferasi, migrasi dan pluripotensi namun semakin tinggi kadar glukosa akan sebaliknya. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan kadar tinggi glukosa menyebabkan gangguan pada proses penyembuhan luka diabetik. Hanya saja penggunaan model dengan sel fibroblast manusia pada penelitian ini menunjukkan bahwa sel fibroblast (HDF) lebih toleran terhadap kadar glukosa tinggi.

## Simpulan

Kemampuan proliferasi, migrasi dan ekspresi gen OCT-4 masih dapat dipertahankan dalam keadaan glukosa tinggi tergantung dosis. Pemberian kadar glukosa tinggi memberikan dasar untuk pengembangan terapi dalam

kondisi diabetes bahwa terapi sel dermal fibroblast manusia dapat meningkatkan penyembuhan luka meskipun dalam kondisi glukosa tinggi.

#### Daftar Pustaka

- Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W. 1995. High-glucose-D triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 44(11):1323-7.
- Golberg A. *et al.*, 2013. Regeneration and control of human fibroblast cell density by intermittently delivered pulsed electric fields. *Biotechnology and Bioengineering*. 110(6). pp.1759–1768.
- International Diabetes Federation (IDF). 2011. Panduan Global untuk Diabetes Tipe 2 <http://communication@idf.org> NIH. (2006). Regenerative Medicine. Department of Health and Human Services USA.
- Metcalf and Ferguson. 2007. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, *stem cells* and regeneration, *J R Soc Interface*. Jun 22; 4(14): 413–437.
- Patel S, Shikha Srivastava, Manju Rawat Singh, Deependra Singh. 2019. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 112 : 108615.
- Racila D, Michael Winter, Mohammed Said, Ann Tomanek-Chalkley, Susan Wiechert, Richard L. Eckert and Jackie R. Bickenbach. 2011. Transient expression of OCT-4 is sufficient to allow human keratinocytes to change their differentiation pathway, *Gene Ther*. Mar; 18(3): 294–303.
- Waspadji S. dkk. 2002. Pedoman Diet Diabetes Mellitus Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Halaman 7-8
- Willershausen-Zonnchen B, Lemmen C, Hamm G. 1991. Influence of high glucos concentrations on glycosaminoglycan and collagen synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol*; 18(3):190-5.
- Yazdanpanah L. Nasiri M and Sara Adarvishi. 2015. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World J Diabetes*. Feb 15; 6(1): 37–53.
- Zhang W. Yun Zhu, Jia Li. *et al.*, 2016. Cell-Derived Extracellular Matrix: Basic Characteristics and Current Applications in Orthopedic Tissue Engineering Tissue engineering: Part B Volume 22.3.
- Zhao J, Li Hu, Jiarong Liu, Niya Gong and Lili Chen. 2013. The Effects of Cytokines in Adipose *Stem Cell*-Conditioned Medium on the Migration and Proliferation of Skin Fibroblasts In Vitro, *Biomed Res Int.*: 578479.