

Evaluasi Kemampuan Proliferasi, Diferensiasi dan Viabilitas Sel Punca Asal Pulpa Gigi Manusia Pasca Vitrifikasi

Evaluation of The Ability of Proliferation, Differentiation and Viability of Human Dental Pulp Stem Cell Post Vitrification

Restu Syamsul Hadi¹, Indra Kusuma²

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

²Department of Fisiology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta
Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta 10510

Telephone. 021-4206674, 4206675, 4206676

Correspondence Email: restuhadi@gmail.com or restu.syamsul@yarsi.ac.id

Abstrak

Sejumlah keterbatasan sumber sel pulpa gigi manusia diantaranya harus dari pulpa gigi sehat dengan jumlah sangat terbatas. Teknologi penyimpanan sel dan pengembangan metode vitrifikasi pada DPSC dan MSC sangat bermanfaat untuk keperluan terapi. Penelitian ini bertujuan mengkaji pertumbuhan, proliferasi dan diferensiasi serta pengaruh simpan beku metode vitrifikasi terhadap sel punca asal pulpa gigi. Sampel yang digunakan adalah pulpa gigi yang diisolasi. Untuk mengukur proliferasinya digunakan Cell Proliferation Reagent WST-1 Absorbansi diukur menggunakan mikroplate ELISA Zenyth pada panjang gelombang 450 nm. Untuk proses simpan beku dengan metode vitrifikasi sel MSC dipanen dan di-cryopreservasi dengan dua langkah yaitu diberikan dengan Equilibration (EQ) dan vitrifikasi solutions (VS). Untuk diferensiasi sel adipogenik digunakan StemPro Adipogenesis dan diuji dengan pewarnaan Oil Red O. DPSC berhasil diisolasi dan tumbuh dengan baik pada medium alfa MEM dengan serum 10%. Kemampuan proliferasi sel DPSC pada inkubasi 24 jam lebih tinggi secara signifikan dibandingkan inkubasi 18 jam. DPSC dapat terdiferensiasi menjadi *neural like cells* dan pada sel MSC dengan pemberian differentiation Kit StemPro Adipogenesis, diferensiasi MSC ke arah sel adipogenik setelah pewarnaan menggunakan Oil Red O. Teknik vitrifikasi sebagai metode simpan beku pada MSC menunjukkan viabilitas yang tinggi (> 80%) dan sel mampu berproliferasi dan berdiferensiasi dengan baik.

Kata kunci : dental pulp, diferensiasi, viabilitas, vitrifikasi

Abstract

A number of limitations of the source of human dental pulp cells include the very limited number of healthy dental pulp. Cell storage technology and the development of vitrification methods in DPSC and MSC are very useful for therapeutic purposes. This study aims to examine growth, proliferation and differentiation, and the effect of vitrification methods on dental pulp stem cells. Dental pulp was isolated from healthy human teeth. cell proliferation was measured using Cell Proliferation Reagent WST-1. Absorbance was measured using Zenyth ELISA microplate at a wavelength of 450

nm. Vitrification method is used to the frozen storage. MSC cell is harvested and cryopreserved with two steps, added Equilibration (EQ) and vitrification solutions (VS). Cell differentiation testing is used StemPro Adipogenesis and colored Oil Red O. DPSC has successfully isolated and growing well on alpha MEM medium and 10% serum. The ability of DPSC cell proliferation at 24-hour incubation was significantly higher than the 18-hour. The vitrification technique, as frozen storage method of MSC, shows high viability (>80%) and cells are able to proliferate and differentiate well.

Keywords : dental pulp, differentiation, viability, vitrification

Pendahuluan

Riset kedokteran regeneratif membuka peluang untuk berbagai jenis terapi khususnya terapi regeneratif pada luka khususnya terapi sel dapat menggunakan sel punca mesenkim (*Mesenchymal Stem Cells/MS*C). MSC diketahui direkrut ke daerah luka dan membantu penyembuhan dengan berdiferensiasi menjadi sel-sel kulit (Sasaki *et al.*, 2008). MSC umumnya diperoleh dari sumsum tulang, darah umbilikus bahkan dari darah tepi. Salah satu sumber alternatif lainnya adalah pulpa gigi. Sel punca asal pulpa gigi (*Dental Pulp Stem Cells/DPSCs*) diketahui memiliki karakteristik menyerupai sel punca mesenkim (Gronthos *et al.*, 2000).

Sejak sel punca mesenkim pulpa berhasil diisolasi oleh Gronthos (2000), maka hampir semua teknik rekayasa jaringan di bidang kedokteran gigi menggunakan sel punca dari jaringan pulpa gigi, sedangkan keterbatasan yang dimiliki oleh sel pulpa gigi manusia cukup banyak, diantaranya selain harus diperoleh dari jaringan pulpa gigi sehat dengan indikasi yang terbatas, jumlah/volume jaringan yang diperoleh dari gigi tersebut sangat terbatas, sehingga untuk menyediakan sumber sel punca yang diperlukan untuk kebutuhan klinik menjadi sulit.

Pada teknik rekayasa jaringan, sumber sel sangat penting dan sering menjadi masalah utama. Selama ini penggunaan DPSC gigi tidak

possibly diambil dari pasien itu sendiri disamping isolasi DPSC yang terbaik diperoleh dari pulpa sehat, sehingga sulit dipergunakan untuk keperluan klinik. Oleh karena itu teknologi penyimpanan akan sangat bermanfaat untuk keperluan terapi di masa depan.

Diferensiasi MSC ke arah adiposa menggunakan medium diferensiasi yang sesuai. Penggunaan Fetal Calf Serum umumnya dapat mendorong induksi adipogenik secara spontan. Beberapa bahan seperti deksametason, 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX), Insulin konsentrasi tinggi dikenal sebagai agen yang mendorong diferensiasi adipogenik (Niemela *et al.*, 2008; Sharifi *et al.*, 2012).

Vitrifikasi adalah metode simpan beku yang telah sukses digunakan pada embrio, *inner cell mass* (ICM), sel punca embrional dan spermatozoa. Vitrifikasi banyak digunakan oleh praktisi fertilisasi in vitro untuk pembekuan pada fase blastosis. Tehnik ini hanya membutuhkan tahap equilibrium singkat dengan larutan krioprotektan sebelum langsung dicelupkan dalam nitrogen cair (Isachenko *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2010; Desai *et al.*, 2011)

Sumber DPSC umumnya berasal dari gigi susu atau gigi molar ke-3 yang mengalami impaksi dan harus dioperasi. Penggunaan DPSC pada ulkus diabetes membutuhkan teknologi penyimpanan atau kriopreservasi yang baik.

Satu metode kriopreservasi yaitu vitrifikasi yang biasa digunakan pada bidang fertilisasi in vitro dan telah digunakan pada sel punca mesenkim (Moon *et al.*, 2008; Desai *et al.*, 2011). Pengembangan metode vitrifikasi pada DPSC dan MSC pada umumnya masih perlu menjadi kajian yang menarik untuk dilakukan penelitian sehingga perlu kajian kemampuan pertumbuhan, proliferasi dan diferensiasi sel punca mesenkim asal pulpa gigi setelah vitrifikasi.

Bahan dan Metoda Penelitian

Sampel diambil dari hasil tindakan ekstraksi gigi setelah pasien menandatangani *informed consent*. Subjek penelitian secara in vitro adalah sel punca hasil isolasi dari pulpa gigi manusia. Sel punca diisolasi DPSCs dari gigi molar 3 atau pre molar 1 (pasien usia 18–30 tahun).

Isolasi & kultur DPSC

Pulpa gigi diisolasi dan diberikan larutan enzim 3 mg/ml collagenase type I dan 4 mg/ml dispase selama 1 jam pada suhu 37°C. Suspensi sel (1×10^4 to 2×10^4 sel/ml) dikultur dalam cawan menggunakan DMEM dengan suplementasi 10% fetal bovine serum (FBS), dinkubasi pada suhu 37°C dalam 5% CO₂. (modifikasi Sakai *et al.*, 2012 dan Yildirim, 2013).

Isolasi dental pulp setelah ekstraksi gigi yang dilakukan oleh dokter gigi. Gigi dimasukkan ke dalam transport medium yang berisi PBS dan Penstrep 5% sampai ke laboratorium. Selanjutnya dilakukan dekontaminasi dengan merendam sampel pada povidone iodine selama 2 menit sebanyak 2x dan dilanjutkan dengan direndam pada Etanol (Brataco) 70% juga selama 2 menit sebanyak 2x.

Setelah dekontaminasi sampel dibilas dengan PBS (Sigma) dan dibelah dengan menggunakan mortar. Setelah terbelah maka

jaringan pulpa diambil menggunakan pinset runcing untuk dilanjutkan isolasi DPSC menggunakan metode digesti enzimatik. Setelah dicuci dengan PBS steril, jaringan pulpa dipotong sekecil mungkin kurang lebih 1 mm. Selanjutnya jaringan dimasukkan dalam tabung eppendorf yang berisi 2 mg/ml collagen tipe I untuk diinkubasi selama 45 menit.

Setelah inkubasi suspensi sel ditriturasi dengan pipet serologik 5 ml dan disaring menggunakan cell stainer 70 um. Suspensi sel disentrifugasi pada selama 7 menit pada 1500 rpm. Pelet yang terbentuk diresuspensi dengan medium alpha MEM, FBS 10% dan 1% penstrep di kultur pada cawan kultur diameter 60 mm. Kultur sel primer diganti mediumnya setelah seeding atau 2 x 24 jam setelah penanaman. Untuk penggantian medium selanjutnya setiap 3-4 hari. Setelah konfluensi >80% pasasi dilakukan menggunakan Trypsin/EDTA 0,1% selama 10 menit. Kultur P1 dan seterusnya ditanam pada konsentrasi 20.000 viabel sel/sqcm.

Uji proliferasi dan viabilitas sel dengan WST-1

Sel DPSC dikultur dalam cawan kultur 96 well. Ditanam dengan jumlah 4000, 6000, 8000, 10000 dan 12000. Diinkubasi dalam waktu 18 dan 24 jam masing-masing dengan triplicate. Untuk mengukur proliferasinya ditambahkan 10 ul. Cell Proliferation Reagent WST-1 sehingga total volume menjadi 100 ul dengan inkubasi selama 60 menit dalam incubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂. Ukur absorbansi masing-masing sampel dan blank sebagai control menggunakan mikropate ELISA Zenyth 340r pada panjang gelombang 450 nm.

Prosedur Vitrifikasi dan thawing

Sel MSC dipanen dan di-cryopreservasi dengan dua langkah yaitu diberikan dengan Equilibration (EQ) dan vitrifikasi solutions (VS).

Larutan EQ terdiri dari 10% ethylene glycol (EG) dan VS tersusun dari 15% EG, 15% DMSO dan 0.5 M sucrose (Sigma). Semua larutan berbasis PBS yang mengandung 20% FBS.

Sampel sel sejumlah 1×10^6 MSCs (10 μ l) dilarutkan dalam 50 μ l EQ selama 5 menit dan dilanjutkan dicampur dengan 500 μ l VS selama 45 detik. Selanjutnya suspensi sel ditransfer ke dalam 1.2 ml cryovials (Nunc) dan secepatnya dimasukkan ke dalam tabung berisi nitrogen cair. Waktu penyimpanan selama 1 minggu untuk selanjutnya di-thawing.

Sel di-thawing dengan cepat dengan cara merendam tabung dalam bak air pada suhu 37°C. Setelah dihangatkan selama sekitar 7 detik sel diberikan secara bertahap dengan 0,5, 0,25 dan 0 M sukrosa dalam PBS yang mengandung 20% FBS. Setelah pencairan, dilakukan pengukuran viabilitas dengan metode pewarnaan biru tripan. Sel-sel yang tersisa disentrifugasi pada 1500 rpm selama 10 menit dan dicuci tiga kali dengan DMEM dengan 20% FBS dan 1% Penstrep. Sel selanjutnya ditanam dalam cawan kultur 25 cm².

Pengumpulan Data dan Analisis Statistik

Proliferasi sel dilakukan menggunakan kultur pada plate 96 well dengan seeding pada 4.000, 6.000, 8.000, 10.000 dan 12.000 sel per well, jumlah sel dihitung pada hari ke dua. Pada hari kedua dilakukan uji viabilitas sel menggunakan WST-1. Laju proliferasi didapatkan dengan membaca perubahan warna yang terjadi menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 450 nm dengan inkubasi 18 dan 24 jam.

Untuk uji vitrifikasi dilakukan dengan menghitung viabilitas dan kematian sel sebelum dan setelah vitrifikasi menggunakan trypan blue. Untuk diferensiasi dilakukan dengan menggunakan stemPro Adipogenesis dan

pewarnaan dengan Oil Red O. Kultur DPSC diukur kemampuan pertumbuhan dan proliferasinya dan didiferensiasi ke arah adipogenik dengan medium diferensiasi MSC hingga terdapat droplet lipid. Droplet lipid kemudian diwarnai dengan Oil Red O untuk konfirmasi. Hasil pengukuran uji proliferasi dan viabilitas sel dibuat rata-rata dan digunakan One-way ANOVA untuk membandingkan antar kelompok perlakuan dan dengan kelompok kontrol. Uji statistik dengan $P < 0.05$ menunjukkan perbedaan bermakna.

Hasil Penelitian

Pertumbuhan Dental Pulp Stem Cells (DPSC)

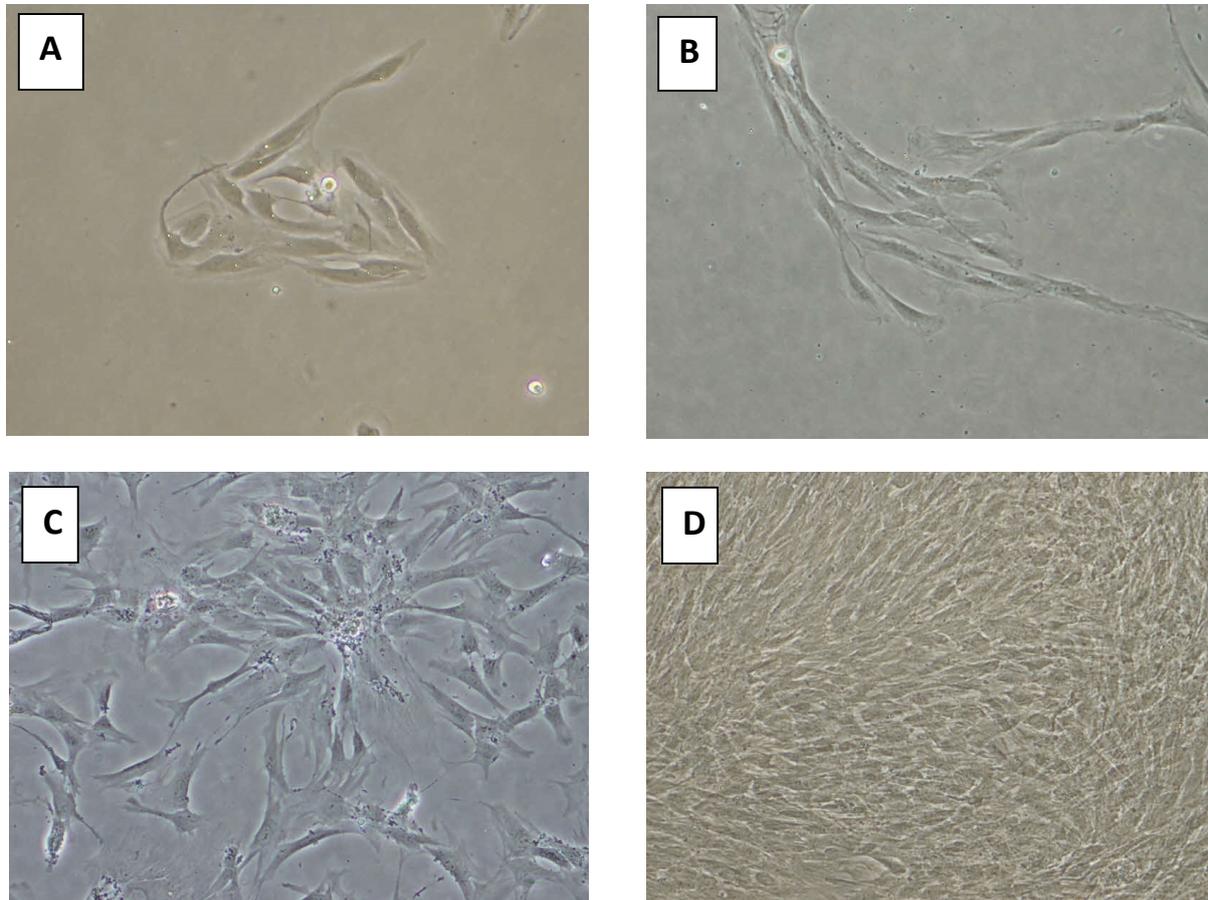
Penelitian ini dilakukan menggunakan kultur primer sel yang berasal dari pulpa gigi manusia dewasa. Pulpa gigi merupakan jaringan lunak heterogen yang terletak di tengah gigi, serta mengandung berbagai jenis sel dan molekul matriks ekstraseluler. Sel hasil isolasi memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi beberapa macam jenis sel sehingga merupakan sel punca yang dikenal dengan Dental Pulp Stem cells (DPSC).

Penelitian ini berhasil melakukan isolasi secara enzimatik menggunakan collagenase tipe I. Kultur DPSC selanjutnya dapat tumbuh hingga confluent pada kultur setelah 2 minggu dari koloni sel. Selanjutnya dilakukan pasasi dan disub kultur pada cawan kultur yang baru. Pertumbuhan secara morfologi dan jumlah sel dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop inverted.

Morfologi DPSC secara mikroskopis setelah masa inkubasi diawal seeding 48 jam (Gambar 1A) dan setelah 72 jam (Gambar 1) menunjukkan gambaran sel berbentuk fibroblastic. Pada inkubasi lebih lanjut sel mengalami pertumbuhan hingga memadati dasar

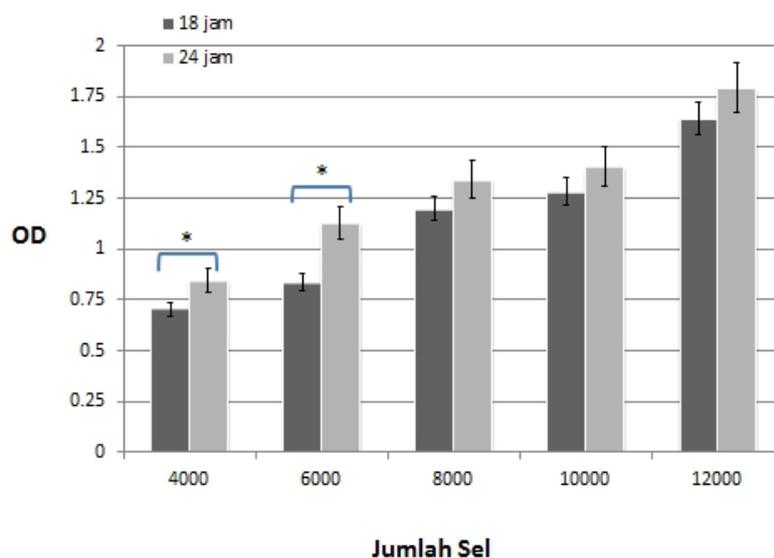
cawan kultur/ konfluen (Gambar 1D). Sel DPSC yang tumbuh dengan baik pada medium alfa MEM dengan serum 10% tampak adanya juluran

sitoplasmatik (pseudopodia) dan melekat (plating) di dasar cawan kultur.



Gambar 1. Pertumbuhan sel DPSC. Kultur pada awal seeding 48 jam (A), pertumbuhan pada 72 jam (B), pertumbuhan pada satu minggu (C), pertumbuhan confluent pada 2 minggu (D). Pengamatan dengan inverted mikroskop perbesaran 200 x.

Proliferasi Dental Pulp Stem Cells (DPSC)



Gambar 2. Grafik proliferasi sel yang diukur dengan uji WST-1.

Pada gambar 2, tampak adanya proliferasi sel pada inkubasi 24 jam dengan jumlah sel 4000 dan 6000 lebih tinggi secara signifikan dibandingkan pada inkubasi 18 jam dengan $P < 0,05$. Sedangkan pada jumlah sel yang lebih banyak yaitu 8000, 10000 dan 12000 menunjukkan proliferasi dengan waktu inkubasi 18 dan 24 jam tidak berbeda. Hal ini dapat dijelaskan bahwa dengan kepadatan sel yang tinggi karena ditanam pada cawan kultur 96 well maka proliferasi menjadi lebih lambat karena ruang untuk perbanyakannya menjadi terbatas.

Pada penelitian ini DPSC dapat terdiferensiasi menjadi neural like cells dengan morfologi yang sebelumnya seperti fibroblast menjadi tampak adanya perkembangan mirip akson maupun dendrit.

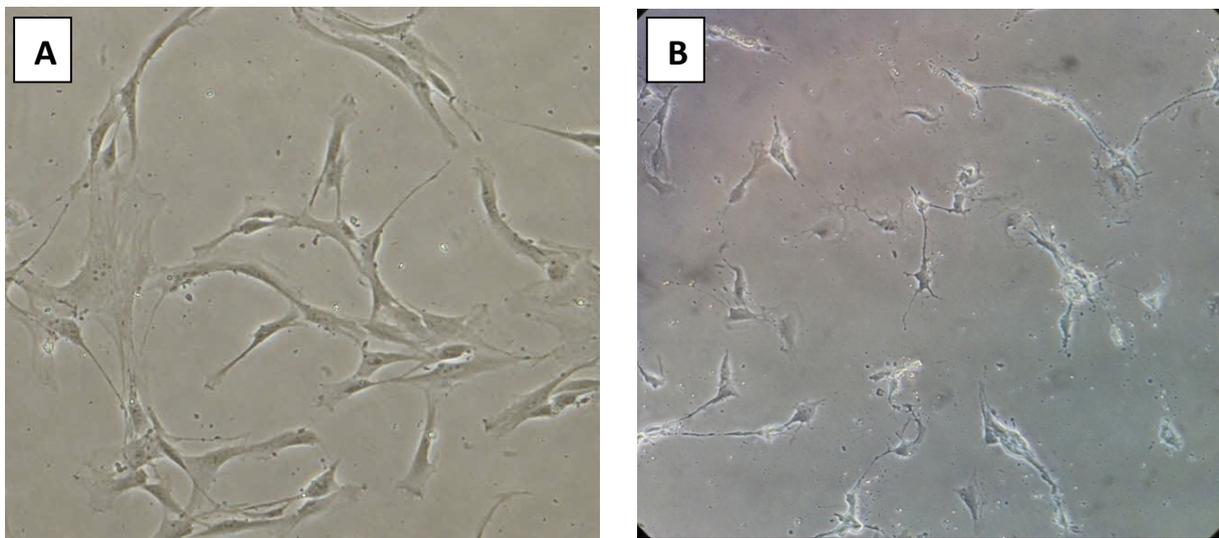
Pada penelitian ini diferensiasi MSC ke arah adiposa menggunakan differentiation Kit StemPro Adipogenesis (Gibco) setelah sel MSC

70% confluen. Pengamatan dilakukan pada hari ke 7 setelah pemberian medium diferensiasi.

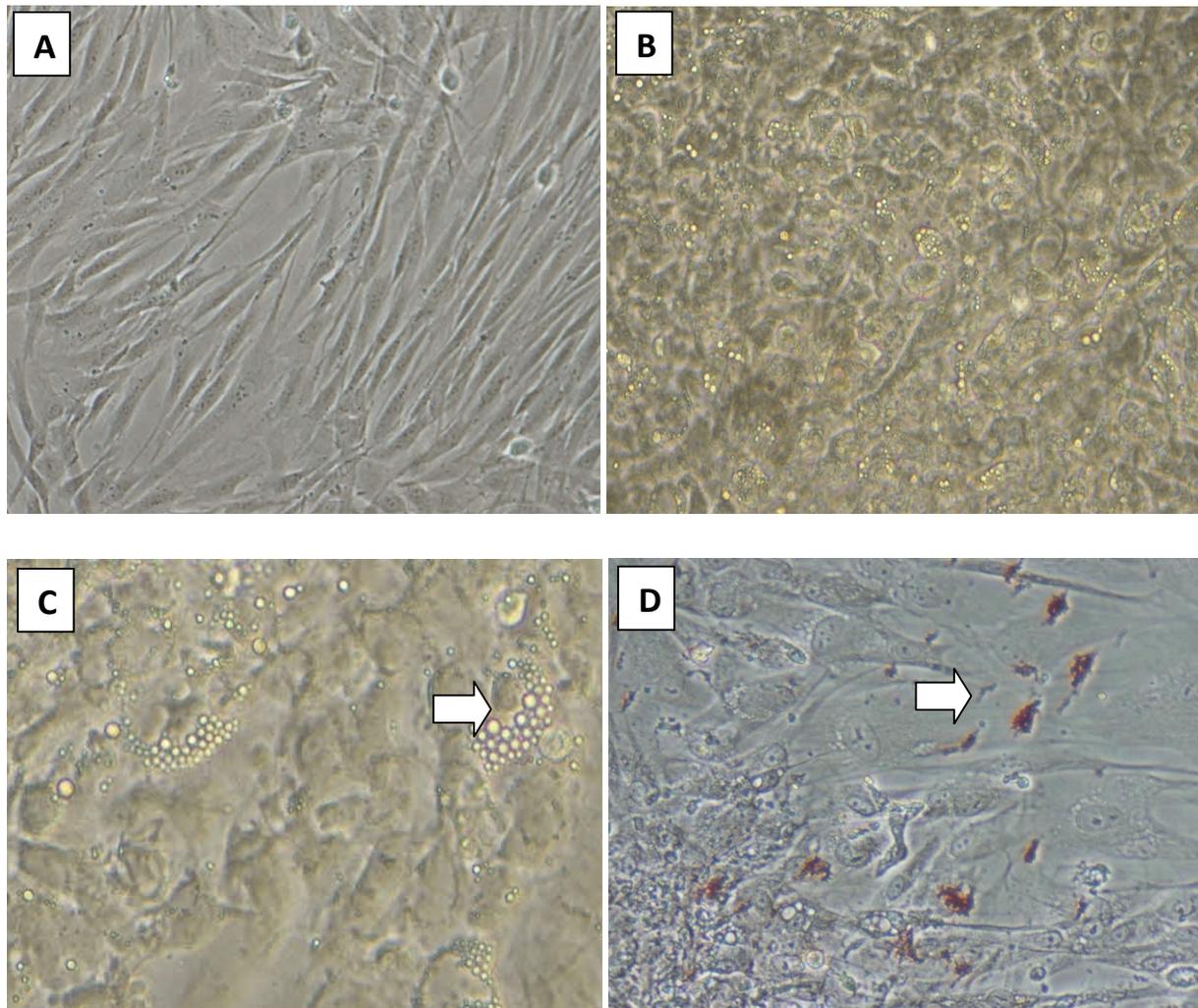
Viabilitas sel post-kriopreservasi dengan metode vitrifikasi

Viabilitas sel MSC diukur dengan pewarnaan trypan blue. Setelah thawing post-vitrifikasi diperoleh jumlah sel keseluruhan sebesar $5,41 \times 10^5$. Viabilitas sel berkisar antara 81-89% dan rata-rata sejumlah 84,6%. Hasil penelitian tersebut masih menunjukkan adanya sel yang hilang sebesar 32% yang kemungkinan terjadi pada saat proses pembekuan dan thawing. Namun demikian total sel hidup/viabilitas sel yang diperoleh masih tinggi (tabel 1).

Diferensiasi sel DPSC/ MSC



Gambar 3. Diferensiasi sel DPSC menjadi *neuronal like cells*. Sel DPSC sebelum diferensiasi tampak morfologi *fibroblastic like* (A) dan setelah diferensiasi tampak juluran *dendritic* dan *axon like* (B). Pengamatan dengan mikroskop inverted dengan perbesaran 100 x.



Gambar 4. Diferensiasi sel MSC menjadi sel adipogenik. Sel MSC sebelum diferensiasi tampak morfologi *fibroblastic like* (A), setelah diferensiasi menjadi sel adipogenik, tampak tetes-tetes minyak di dalam sitoplasma (B-C). Setelah diferensiasi menjadi sel adipogenik dan diwarnai menggunakan Oil Red O (D). Pengamatan dengan mikroskop inverted dengan perbesaran 100 x.

Tabel 1. Jumlah sel setelah penyimpanan dengan metode vitrifikasi

Rerata Jumlah sel pre-vitrifikasi	Rerata Jumlah sel post-vitrifikasi	Persentase sel <i>lost</i> post-vitrifikasi	Jumlah total sel post-vitrifikasi	Jumlah sel hidup post-vitrifikasi	Persentase viabilitas sel post-vitrifikasi
8×10^5	$5,41 \times 10^5$	32 %	$5,25 \times 10^5$	$4,25 \times 10^5$	81 %
			$5,62 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	89 %
			$5,37 \times 10^5$	$4,50 \times 10^5$	84 %

Diskusi

Kultur sel DPSC menunjukkan tipe sel dengan pertumbuhan selapis (monolayer) sehingga tidak terjadi penumpukan sel. Hal ini menunjukkan bahwa DPSC merupakan sel normal yang memiliki mekanisme hambatan

kontak (*contact inhibition*) sehingga dapat menghentikan pertumbuhan sel setelah bersentuhan dengan sel tetangganya.

Sel punca pulpa gigi dapat menghasilkan karakter multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel, seperti

kondrosit, adiposa, osteoblas, miosit, sel neural dan kardiomiosit. Sel punca pulpa gigi ditandai dengan ekspresi negatif untuk antigen hematopoetik (seperti., CD45, CD34, CD14), dan ekspresi positif untuk marker yang-berhubungan-dengan-stroma (seperti., CD29, CD73, CD105, CD44) dan protein matriks ekstraselular seperti kolagen, vimentin, laminin dan fibronectin (Halim *et al.*, 2010; Mitsiadis *et al.*, 2011).

Sel punca mesenkim (*Mesenchymal Stem Cells/MS*C) diketahui mengalami perekrutan ke daerah luka dan sanggup berdiferensiasi menjadi sel-sel kulit. Penggunaan MSC untuk membantu penyembuhan ulkus diabetik membutuhkan sumber MSC yang mudah didapat. Pulpa gigi adalah salah satu sumber MSC alternatif selain sumsum tulang, darah tepi, dan darah umbilikal. Sel punca pulpa gigi (*Dental Pulp Stem Cells/DPSC*) diketahui memiliki karakteristik multipoten yang sebanding dengan MSC (Gronthos *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2008).

Pada gigi manusia, niche sel punca secara anatomi dapat ditemukan di pulpa gigi. Sel punca pulpa gigi dapat menghasilkan karakter multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel, seperti kondrosit, adiposa, osteoblas, miosit, sel neural dan kardiomiosit. Sel punca pulpa gigi ditandai dengan ekspresi negatif untuk antigen hematopoetik (seperti., CD45, CD34, CD14), dan ekspresi positif untuk marker yang-berhubungan-dengan-stroma (seperti., CD29, CD73, CD105, CD44) dan protein matriks ekstraselular seperti kolagen, vimentin, laminin dan fibronectin (Halim *et al.*, 2010; Mitsiadis *et al.*, 2011).

Pulpa gigi merupakan jaringan lunak heterogen yang terletak di tengah gigi, serta mengandung berbagai jenis sel dan molekul matriks ekstraseluler. Dentin maupun pulpa

berasal dari neural crest yang selama tahap embrional dari perkembangan gigi, pulpa merupakan jaringan lunak yang lengkap dengan system mikrovaskularisasi, persyarafan, induksi dan pertahanan serta merupakan sumber yang kaya dengan sel punca mesenkim. Sel tersebut memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel. Fungsi utama dari pulpa adalah menghasilkan dentin, mulai dentin primer sejak awal perkembangan gigi, dentin sekunder sepanjang kehidupan gigi, serta dentin tersier yang diakibatkan rangsang pathogen (Mauth *et al.*, 2007).

Hasil penelitian menunjukkan pertumbuhan sel dengan baik hingga konfluen yang merupakan hal yang penting dalam penelitian *in vitro*. Selanjutnya DPSC dapat dipasasi/subkultur untuk ditanam pada cawan kultur untuk dilakukan pengujian lanjutan. Sebelum dilakukan penanaman maupun perlakuan jumlah dan viabilitas selnya dihitung dengan metode *tripan blue dye exclusion* (pengecatan tripan biru).

Isolasi sel DPSC pada penelitian sebelumnya oleh Ahmed *et al.* (2011) menunjukkan bahwa sel DPSC memiliki jumlah kumulatif sel yang tinggi dan proliferasi daya hidup yang panjang. Sel DPSC dapat melanjutkan proliferasinya secara baik hingga generasi ke 25 pasasi. DPSC merupakan salah satu jenis dari MSC yang memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel.

Sel punca pulpa gigi dapat menghasilkan karakter multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel, seperti kondrosit, adiposa, osteoblas, miosit, sel neural dan kardiomiosit. Sel punca pulpa gigi ditandai dengan ekspresi negatif untuk antigen hematopoetik. Penggunaan MSC untuk

membantu penyembuhan ulkus diabetik membutuhkan sumber MSC yang mudah didapat. Pulpa gigi adalah salah satu sumber MSC alternatif selain sumsum tulang, darah tepi, dan darah umbilikal. DPSC diketahui memiliki karakteristik multipoten yang sebanding dengan MSC pada umumnya (Gronthos *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2008).

Diferensiasi DPSC menjadi sel yang mirip sel saraf telah dilaporkan sebelumnya oleh Arthur *et al.*, (2008). Kemampuan multipotensi DPSC dapat dievaluasi dengan sejumlah uji seperti yang dapat dilakukan dengan C kit+ /CD34+/STRO-1+ dari sel DPSC yang selanjutnya dapat berdiferensiasi menjadi osteoblast-like atau adipocyte-like cells (Ahmed *et al.*, 2011). Sel MSC yang semula dengan morfologi seperti fibroblast menjadi sferis dengan sitoplasma berisi tetes minyak. Pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa penggunaan Fetal Calf Serum (FCS) pada umumnya dapat mendorong induksi adipogenik secara spontan. Pemberian sejumlah zat kimia seperti deksametason, 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX), insulin konsentrasi tinggi dapat mendorong diferensiasi menjadi sel adipogenik (Niemela *et al.*, 2008; Sharifi *et al.*, 2012).

Atari *et al* (2011) menjelaskan bahwa perkembangan embrional pulpa gigi berasal dari tiga lapis benih yaitu ectodermal, mesoderma, dan endodermal. Sel pulpa gigi selanjutnya dapat diidentifikasi menjadi *stem cell human exfoliated deciduous teeth* (SHEDs), *periodontal ligament stem cells* (PDLSCs), *dental follicle progenitor cells* (DFPCs), *stem cells from apical papilla* (SCAPs) dan *dental pulp pluripotent stem cells* (DPPSC).

Sel punca bersifat pluripoten, yaitu memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi bermacam-macam jenis sel sesuai dengan

kebutuhan yang timbul. Sel ini merupakan sel yang pertama kali membelah ketika terjadi cedera. Sel tersebut dapat menjadi fibroblas maupun odontoblas. Selama peradangan sel-sel tersebut dapat berdiferensiasi menjadi makrofag atau sel resopsi (dentinoklas). Sel punca dewasa lebih terbatas dan biasanya spesifik terhadap jaringan, dalam arti sel-sel tersebut hanya dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel yang ditemukan di jaringan dari mana sel induk tersebut berasal (Murray dan Windsor, 2002).

Pada keadaan khusus sel-sel mesenkhim yang belum berdiferensiasi di dalam pulpa dapat berdiferensiasi menjadi odontoblas dan menghasilkan dentin reparatif. Keadaan ini sesuai dengan gambaran sel punca mesenkhim dalam pulpa yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi jenis sel lainnya, termasuk fibroblas untuk memperbaiki jaringan pulpa yang rusak. Kemampuan untuk merangsang sel punca berdiferensiasi menjadi sel mirip odontoblas lebih baik dibandingkan fibroblast dan hal ini penting dalam proses perbaikan dentin (Mauth *et al.*, 2007; Murray dan Windsor, 2002).

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). (Halim *et al.*, 2010). Metode yang umum digunakan adalah pembekuan lambat dengan laju penurunan suhu 1 C/menit. Metode tersebut membutuhkan tahap pembekuan pada -80C selama *overnight* sebelum masuk ke nitrogen cair keesokan harinya (Freshney, 2005).

Pada metode vitrifikasi dilakukan dengan cara pembekuan cepat. Teknik ini banyak digunakan oleh praktisi fertilisasi *in vitro* untuk pembekuan pada fase blastosis. Zat yang dibutuhkan pada tahap equilibrium singkat dengan larutan krioprotektan sebelum langsung dicelupkan dalam nitrogen cair (Isachenko *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2010; Desai *et al.*, 2011). Pada penelitian Bahadori *et al.* (2009) yang menggunakan sel MSC asal sumsum tulang dilaporkan viabilitas sel post vitrifikasi sejumlah 81,33%. Dengan demikian hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menghasilkan viabilitas sel di atas 80%. Simpan beku (kriopreservasi) merupakan sebuah metode untuk menyimpan sel dalam keadaan inaktif dengan cara melakukan pendinginan hingga mencapai suhu yang sangat rendah yang kemudian sel dapat direaktivasi kembali. Suhu untuk menyimpan sel dalam waktu yang lama di dalam nitrogen cair yaitu -196°C (Halim *et al.*, 2010).

Metode penyimpanan ini berbeda dengan yang pada umumnya digunakan dengan cara pembekuan lambat dengan laju penurunan suhu $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$. Metode tersebut membutuhkan tahap pembekuan pada -80°C selama overnight sebelum masuk ke nitrogen cair keesokan harinya (Freshney, 2005).

Penggunaan teknik vitrifikasi layak sebagai metode simpan beku sel karena luaran teknik vitrifikasi memiliki viabilitas yang tinggi. Sesuai dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Bahadori *et al.* (2009) bahwa stem sel/ MSC yang disimpan dengan metode vitrifikasi menghasilkan viabilitas yang lebih baik dari pada metode *slow cooling* dan masih dapat untuk dilakukan diferensiasi menjadi berbagai jenis sel.

Simpulan

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa pulpa gigi dapat menjadi sumber mesenchimal stem sel (MSC). Dental Pulp Stem Cells (DPSC) menunjukkan pertumbuhan dan kemampuan proliferasi yang baik dengan daya hidup yang panjang pasca vitrifikasi. Mesenchimal stem cell dapat berdiferensiasi menjadi sejumlah sel lain seperti *neuron like cells* dan sel adipogenik. Penyimpanan MSC dengan metode vitrifikasi menghasilkan viabilitas sel pasca panen yang tinggi dan dapat ditumbuhkan kembali hingga confluent sehingga membuka peluang untuk digunakan sebagai terapi khususnya terapi regenerative.

Daftar Pustaka

- Ahmed NE, Aboul-Ezz EH, Zakhary SY. *et al.*, 2011. Isolation of Dental Pulp Stem Cells and their *In Vitro* Differentiation into Odontoblast-like Cells. *Macedon J..Med.Sci.* 2011 Sep 30; 4(3):253-260.
- Atari M, Barajas M, Hernández-Alfaro F *et al.* 2011. Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histol Histopathol* 26: 1057-1070
- Bahadori MH, Soltani B, Mirzajani E, *et al.* 2009. Cryopreservation of Rat Bone Marrow Derived Mesenchymal, *Yakhteh Medical Journal*, 11 (3) : 317-326
- Desai N, Xu J, Tsulaia T, Szeptycki-Lawson J, Abdelhafez F, Goldfarb J & Falcone T. 2011. Vitrification of mouse embryo-derived ICM cells: a tool for preserving embryonic stem cell potential? *J Assist Reprod Genet.* 28 (2):93-9
- Freshney RI. 2005. *Culture of Animal Cells A manual of Basic Technique.* Wiley, New Jersey.

- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG & Shi S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS* **98**, 13625-13630.
- Halim D, Murti H, Sandra F, Boediono A, Djuwantono T & Setiawan B. 2010. *Stem Cell : Dasar Teori dan Aplikasi Klinis*. Erlangga.
- IDF. 2011. *The IDF Diabetes Atlas*. International Diabetes Federation.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schondorf T, Mallmann P, Dessole S & Nawroth F. 2004. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction* **19**, 932-939.
- IWGDF. 2011. International Consensus on Diabetic Foot. International Working Group on the Diabetic Foot.
- Metcalfe A & Ferguson M. 2007. Tissue engineering of replacement skin: The crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of The Royal Society* **4**, 413-437.
- Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G & Caton J. 2011. Dental pulp stem cells, niches, and notch signalling in tooth injury. *Adv Dent Res* **22**.
- Mauth AH, Graf-Hausner and Roulet JF. 2007. Restorative Applications for Dental Pulp Therapy. *In Tissue Engineering* **3**:1-32.
- Moon JH, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Lim HJ & Kim HK. 2008. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Human Reproduction* **23**, 1760-1770.
- Murray PE, Windsor LJ. 2002. Analysis of pulpal reaction to restorative procedures, materials, pulp capping and future therapies. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. **6**:508-520.
- Niemela S, Miettinen S, Sarkanen JR & N. Ashammakhi. 2008. Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. *Topics in Tissue Engineering* **4**.
- NIH. 2006. Regenerative Medicine. Department of Health and Human Services USA.
- Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K., et al. 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms, *J Clin Invest*. **122**(1):80-90.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D & Shimizu H. 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *The Journal of Immunology* **180**, 2581-2587.
- Sharifi AM, Ghazanfari R, Tekiyehmaroof N & Sharifi MA. 2012. Isolation, cultivation, characterization and expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cell for use in regenerative medicine. *International Journal of Hematology Oncology and Stem Cell Research* **6**.
- Strom S, Holm F, Bergstrom R, Stromberg A-M & Hovatta O. 2010. Derivation of 30 human embryonic stem cell lines-improving the quality. *In Vitro Cell Dev Biol* **46**, 337-344.
- Suyono S. 2002. Patofisiologi Diabetes Melitus. In *Penatalaksanaan diabetes melitus terpadu*, ed. Soegondo S, Soewondo P &

- Subekti I, pp. 7. Balai Penerbit FKUI, DKI Jakarta.
- UN. 2011. NCDs and MDGs- Succes in Synergy. In *2011 UN High-level meeting on NCDs*. United Nations.
- Waspadji S. 2002. Diabetes melitus, penyulit kronik dan pencegahannya. In *Penatalaksanaan diabetes melitus terpadu*, ed. Soegondo S, Soewondo P & Subekti I, pp. 171. Balai Penerbit FKUI, DKI Jakarta.
- Yildirim S. 2013. Dental Pulp Stem Cells, *SpringerBriefs in Stem Cells*, pp 41-51