

ARTIKEL PENELITIAN

Pengaruh Pemberian *Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly* (MSC-WJ) Terhadap Ekspresi Gen IL-1 β dan Ryr3 Pada Tikus Model *Alzheimer's Disease*

Widia Safitri¹, Hirowati Ali², Djong Hon Tjong³

1. Program Studi Bioteknologi, Program Pascasarjana, Universitas Andalas, Padang, Indonesia; 2. Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia; 3. Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

Korespondensi: Hirowati Ali; e-mail: hirowati_ali@yahoo.com

Abstrak

Tujuan: penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh dari Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly (MSC-WJ) terhadap ekspresi gen IL-1 β dan Ryr3 pada otak tikus sebagai hewan model Alzheimer's disease. **Metode:** Metode yang digunakan untuk mendeteksi ekspresi gen IL-1 β dan Ryr3 dilakukan secara kuantitatif menggunakan Real-Time PCR. **Hasil:** Pemeriksaan ekspresi gen IL-1 β menunjukkan ekspresi gen IL-1 β pada kontrol lebih rendah dibandingkan dengan hewan model perlakuan yang diinduksi A β 1-42 yaitu sebesar 13%, sedangkan tikus yang diberikan treatment MSC-WJ setelah diinduksi dengan A β 1-42 menunjukkan ekspresi gen yang lebih tinggi dibandingkan dengan tikus yang hanya diinduksi dengan A β 1-42 saja yaitu sebesar 66%. Hasil pemeriksaan ekspresi gen Ryr3 pada kontrol menunjukkan ekspresi gen Ryr3 lebih rendah dibandingkan dengan hewan model perlakuan yang diinduksi A β 1-42 yaitu sebesar 52%. Tikus yang diberikan treatment MSC-WJ setelah diinduksi dengan A β 1-42 menunjukkan ekspresi gen yang lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang hanya diinduksi dengan A β 1-42 saja yaitu sebesar 69%. **Kesimpulan:** Kesimpulan dari penelitian ini yaitu Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly (MSC-WJ) tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap ekspresi gen IL-1 β dan memberikan pengaruh berupa penurunan yang signifikan terhadap ekspresi gen Ryr3 pada tikus model Alzheimer.

Kata kunci: Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly (MSC-WJ); IL-1 β ; Ryr3; alzheimer

Abstract

Alzheimer is a brain disease that can damage the patient's memory and thinking ability. This study aims to analyze the effect of Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly (MSC-WJ) on the expression of IL-1 β and Ryr3 genes in rat brain as an animal of Alzheimer's disease model. The method used to detect the expression of IL-1 β and Ryr3 genes was carried out quantitatively by using Real-Time PCR. The results of the test in animal models induced by A β 1-42 showed an increase in the expression of the IL-1 β gene by 13% compared to the control. Meanwhile, the rats given MSC-WJ treatment after being induced with A β 1-42 showed an increase in gene expression by 66% compared to mice that were only induced with A β 1-42 alone. The results of the examination in animal models induced by A β 1-42 showed an increase on Ryr3 gene expression by 52% compared to control. Rats that were given MSC-WJ treatment showed a decrease in gene expression by 69% than rats that were induced only with A β 1-42. Therefore, based on the results of the study, it can be concluded that the Mesenchymal Stem Cell

Wharton's Jelly (MSC-WJ) does not have a significant effect on the expression of the IL-1 β gene. However, it has a significant effect on the expression of the Ryr3 gene in rats of Alzheimer model.

Keywords: *Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly (MSC-WJ); IL-1 β ; Ryr3; Alzheimer's*

PENDAHULUAN

Penyakit Alzheimer merupakan penyakit pada otak yang dapat merusak daya ingat dan kemampuan berpikir pasien, sehingga mempengaruhi kegiatan sederhana yang biasa dilakukan sehari-hari. Oleh karena itu, untuk mempelajari lebih lanjut mengenai mekanisme penyakit Alzheimer, perlu diketahui juga gen-gen terkait yang terlibat pada keempat jalur tersebut dengan penyakit Alzheimer. Gen-gen yang dianalisis pada penelitian ini adalah gen terkait neuroinflamasi dan penyebab stress retikulum endoplasma. Neuroinflamasi merupakan proses inflamasi kompleks yang terjadi pada sistem saraf pusat sebagai mekanisme pertahanan terhadap patogen, toksin dan faktor yang menyebabkan neurodegenerasi¹.

Sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α meningkat dalam plasma, otak, dan cairan serebrospinal pada pasien Alzheimer. IL-1 terdiri dari dua isoform yaitu IL-1 α dan IL-1 β (Syaftef et al., 2008). IL-1 β disekresi oleh mikroglia untuk menyeleksi agen patogen pada otak yang menyebabkan terjadi kerusakan pada sel. Kerusakan pada sel neuron secara fisiologis akan menyebabkan apoptosis. Proses apoptosis diawali di mitokondria dan retikulum endoplasmik (RE) sebagai sumber kalsium. Plak amiloid tersebut menyebabkan stress oksidatif intraseluler, sehingga berlanjut terhadap peningkatan Ca²⁺ ekstraseluler².

Salah satu jenis pengobatan yang dapat digunakan adalah Stem cell. Stem cell merupakan sel yang terdapat pada organisme multiseluler, dapat melakukan pembelahan sel dan berdiferensiasi menjadi beberapa sel spesifik, serta

membentuk stem cell baru³. Stem cell tersebut dapat diambil dari beberapa sumber seperti plasenta dan sumsum tulang. Bagian plasenta yang dapat digunakan sebagai stem cell adalah specific mucous proteoglycan-rich matrix atau biasa disebut *Wharton's jelly*. *Wharton's jelly* terdiri dari sel miofibroblas yang tersebar pada matriks dan memiliki fungsi kontraktif⁴. *Wharton's jelly* digunakan sebagai alternatif dari stem cell yang berasal dari bone marrow dan adiposa tissue⁵. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian mesenchymal stem cell *Wharton's jelly* (MSC-WJ) terhadap tikus model Alzheimer perubahan ekspresi gen IL-1 β dan Ryr3.

METODE

Hewan percobaan yang digunakan adalah *Rattus novergicus* galur wistar jantan berumur 2 bulan sebanyak 18 ekor dengan berat badan berkisar antara 200-300 gram. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group desain*. Pengelompokan hewan terdiri dari 3 kelompok yaitu kelompok I (kontrol/tanpa perlakuan), kelompok II (tikus diberikan dengan AlCl₃ dengan dosis 300 mg/kg BB) dan kelompok III (tikus diberikan AlCl₃ dengan dosis 300 mg/kg BB + MSC-WJ dengan dosis 1 x 10⁶ sel/ml)⁶.

Pembuatan tikus model alzheimer dilakukan dengan pemberian aluminium klorida (AlCl₃) (300 mg/kg BB) yang sudah dicampur dengan larutan aquades secara oral menggunakan sonde selama 5 hari. Pada kelompok III, tikus diinjeksi dengan *stem cells* sebanyak 1 x 10⁶ sel/tikus dalam 300 μ L medium komplit⁷ secara intraperitoneal. Tikus kemudian

dieuthanasi dan dilakukan isolasi jaringan otak untuk pemeriksaan *real-time* PCR. Semua kelompok eksperimen dianalisis menggunakan uji *one-way* ANOVA

menggunakan SPSS. Urutan primer gen yang digunakan untuk analisis ekspresi gen adalah sebagai berikut:

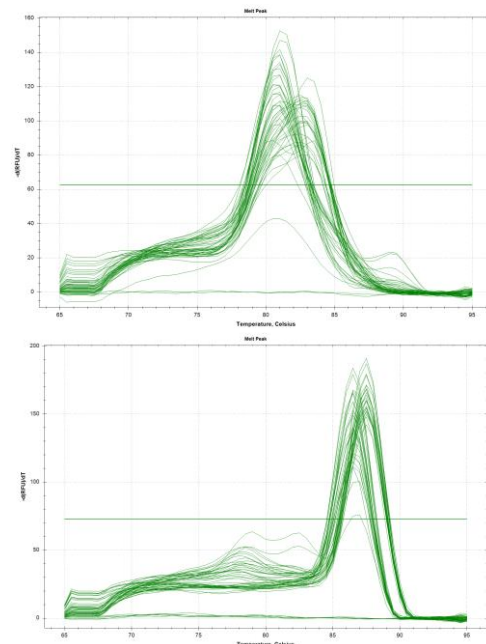
Tabel 1. Urutan primer gen yang digunakan dalam analisis ekspresi gen^{8,9,10}

No	Gen	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
1	GAPDH*	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'	5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3'
2	<i>IL-1β</i> **	5'-ACCCAAGCACCTTCTTTTCTT-3'	3'-TGCAGCTGTCTAATGGGAACAT-5'
3	<i>Ryr3</i> ***	5'-TGGGACAAGTTCGTGAAG -3'	3'-GCCCATGGCAATATCCAA-5'

HASIL DAN PEMBAHASAN

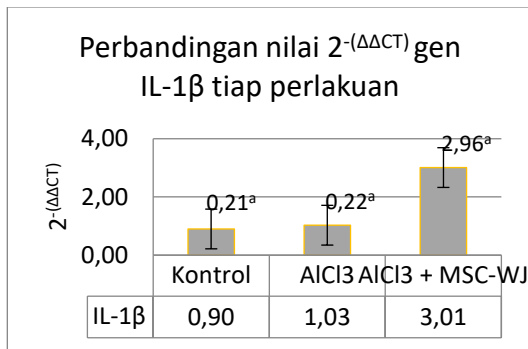
Berdasarkan hasil uji pendahuluan menggunakan pewarnaan *Congo red* pada sampel histopatologi otak tikus model terdapat beberapa plak amiloid pada matrix ekstraseluler. Hal tersebut menunjukkan bahwa $AlCl_3$ dapat menyebabkan akumulasi plak amiloid pada jaringan otak. Senyawa $AlCl_3$ tersebut mengendap di intrasel jaringan saraf sehingga menginduksi proses pemecahan amiloidogenik. Pemecahan amiloidogenik menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen amiloid β ke ekstraseluler, sehingga fragmen-fragmen tersebut bergabung dengan sel-sel saraf lain membentuk plak amiloid. Pada hasil *flowsitometri* MSC-WJ yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi syarat sebagai *stem cell* untuk sebuah penelitian. Sel yang tergolong MSC menurut konsensus *The International Society of Cellular Therapy*, antara lain: menempel pada permukaan plastik saat dilakukan kultur di cawan plastik, serta memiliki molekul protein permukaan (*Cluster of Differentiation/ CD*) CD73, CD90 dan CD105. MSC tidak mengekspresikan CD45, CD34, CD14 dan *Human Leukocyte Antigen-DR* (HLA-DR) seperti pada *stem cell hematopoietik* (HSC)¹¹.

Hasil pemeriksaan menggunakan *real-time* PCR didapatkan *Melt curve* pada amplifikasi gen *IL-1β* dan GAPDH (Gambar 1) menunjukkan dua suhu yang berbeda dengan menggunakan satu sampel, suhu *meltpeak* berkisar 81,0°C dan 82,5°C.



Gambar 1. Kurva *Melt curve* pada amplifikasi gen *IL-1β* (A) dan GAPDH (B)

Berdasarkan hasil perhitungan data yang diperoleh pada gen *IL-1β* menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai *P-Value* > 0,05 dan dapat dilihat pada Gambar 2.



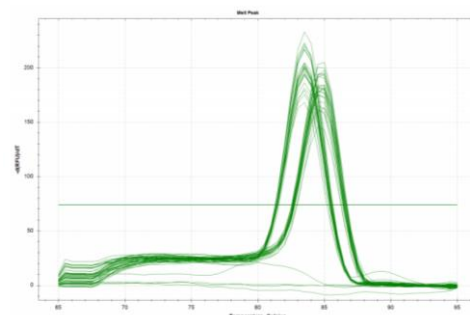
Gambar 2. Diagram Perbandingan nilai $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ gen *IL-1β* tiap perlakuan.

Nilai P sebesar 0,136 atau $P > 0,05$ menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan secara statistik. Huruf dengan *superscript* yang berbeda antar kolom menunjukkan perbedaan nyata pada tingkat kepercayaan 95% ($P > 0,05$) berdasarkan uji *one way* ANOVA.

Hewan model dengan tanpa perlakuan (kontrol) menunjukkan ekspresi gen *IL-1β* lebih rendah dibandingkan dengan hewan model perlakuan yang diinduksi $AlCl_3$ yaitu sebesar 13%. Menurut Praveenkumar *et al.*, (2019) tikus albino yang diberikan $AlCl_3$ secara oral dengan dosis 100 mg/kg BB menyebabkan neurodegeneratif pada daerah hipokampus yang ditandai dengan terdapat deplesi pada badan sel, *acidic cytoplasm* dan vakuola pada nukleus¹². Tikus yang diberikan *treatment* MSC-WJ setelah diinduksi dengan $AlCl_3$ (kelompok 3) menunjukkan ekspresi gen yang lebih tinggi dibandingkan dengan tikus yang hanya diinduksi dengan $AlCl_3$ saja (kelompok 2) yaitu sebesar 66%. Data tersebut menunjukkan bahwa MSC-WJ meningkatkan faktor ekspresi gen *IL-1β* yang merupakan faktor neuroinflamasi pada otak. Hasil tersebut sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Louro *et al.*, (2014) yaitu ekspresi gen *IL-1β* meningkat pada hewan model yang mengalami kerusakan saraf optik

kemudian ditreatment dengan MSC. Menurut Louro *et al.*, (2014) MSC dapat menciptakan lingkungan proinflamasi akibat MSC yang telah mati menghasilkan pelepasan kemokin dan sitokin, diantaranya yaitu *IL-1*¹³. Hal tersebut berbeda dengan beberapa penelitian lain yang sudah dilakukan. Menurut penelitian Chen *et al.*, (2018) pemberian MSC pada hewan model osteoarthritis dengan rute pemberian intra artikular dapat menurunkan ekspresi gen $TNF\alpha$, *IL-1β* dan *IL-6* yang merupakan ekspresi gen neuroinflamasi¹⁴. Penelitian lain dari Rivera *et al.*, (2017) menunjukkan bahwa injeksi MSC dengan rute intradiscal dapat menurunkan ekspresi gen *IL-1β* pada kondisi *discogenic pain* yang disebabkan oleh hernia pada daerah lumbal¹⁵.

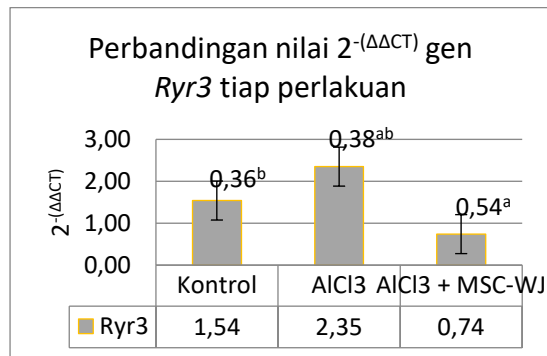
Hasil analisis *Melt curve* pada amplifikasi gen *Ryr3* (Gambar 3) menunjukkan *single peak* pada suhu 85,0°C dengan kisaran T_m 65,0-95,0°C. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa gen target yang digunakan adalah spesifik. Perubahan tingkat ekspresi relatif (*fold change*) pada grafik tersebut adalah > 1 .



Gambar 3. Kurva *Melt curve* pada amplifikasi gen *Ryr3*

Hasil perhitungan data yang diperoleh pada gen *Ryr3* menunjukkan perbedaan signifikan dengan nilai *P-Value* $< 0,05$ dan dapat dilihat pada Gambar 4. Gen reseptor ryanodine 3 (*RYR3*)

mengkode *RyR* yang berfungsi untuk melepaskan ion kalsium retikulum endoplasma yang tersimpan (Ca^{2+}) untuk meningkatkan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler¹⁶. Peningkatan jumlah *RyR* pada spesimen otak menunjukkan gangguan homeostasis Ca^{2+} pada otak pasien AD¹⁷.



Gambar 4. Diagram Perbandingan nilai $2^{-(\Delta\Delta\text{CT})}$ gen *Ryr3* tiap perlakuan.

Nilai *P* sebesar 0,005 atau $P < 0,05$ menunjukkan ada perbedaan signifikan secara statistik. Huruf dengan *superscript* berbeda antar kolom menunjukkan perbedaan nyata pada tingkat kepercayaan 95% ($P < 0,05$) berdasarkan uji *one way ANOVA* dengan uji lanjutan *Tukey's* dan *Duncan*.

Hewan model dengan tanpa perlakuan (kontrol) menunjukkan ekspresi gen *Ryr3* lebih rendah dibandingkan dengan hewan model perlakuan yang diinduksi AlCl_3 yaitu sebesar 52%. Data yang ada menunjukkan bahwa induksi AlCl_3 dengan dosis 300 mg/kg BB rute oral dapat meningkatkan ekspresi gen *Ryr3*. Peningkatan ekspresi gen *Ryr3* menyebabkan akumulasi kalsium di ekstraseluler akibat tekanan oksidatif pada reikulum endoplasma. Retikulum endoplasma berperan dalam sintesis dan pelipatan (folding) protein, respon seluler terhadap tekanan dan homeostasis kalsium. Akumulasi kalsium yang

meningkat di ekstraseluler menyebabkan gangguan pada membran mitokondria, sehingga menyebabkan apoptosis¹⁸.

Tikus yang diberikan *treatment* MSC-WJ setelah diinduksi dengan AlCl_3 (kelompok 3) menunjukkan ekspresi gen yang lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang hanya diinduksi dengan AlCl_3 saja (kelompok 2) yaitu sebesar 69%. Data tersebut menunjukkan bahwa MSC-WJ dapat mengurangi beberapa faktor penyebab apoptosis pada otak secara molekuler yaitu gen *Ryr3* yang berperan dalam influks kalsium pada sel saraf. Kalsium dan sitokrom c merupakan aktivator caspase yang berperan dalam proses apoptosis. Kalsium dilepaskan secara berlebihan akibat mitokondria kehilangan potensial membran, sehingga saluran membran mitokondria akan terbuka¹⁹. Hasil yang sama juga ditemukan pada penelitian Lee *et al.*, (2020) yang dilakukan pada tikus model *Idiopathic Pulmonary Fibrosis* (IPF). Berdasarkan penelitian Lee *et al.*, (2020) MSC dapat menurunkan stres pada retikulum endoplasma yang dilihat berdasarkan ekspresi gen *BiP*²⁰. Menurut Alicka and Krzysztof (2018) *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dapat digunakan sebagai terapi dalam perbaikan stres retikulum endoplasma yang terjadi pada penyakit diabetes melitus 2²¹.

SIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah *Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly* (MSC-WJ) tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap ekspresi gen *IL-1 β* pada tikus model Alzheimer dan *Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly* (MSC-WJ) memberikan pengaruh berupa penurunan yang

signifikan terhadap ekspresi gen *Ryr3* pada tikus model Alzheimer.

DUKUNGAN FINANSIAL

Penelitian ini didanai oleh Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia dengan nomor 12/UN.16.02/Fd/PT.01.03/2020.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih banyak kepada Ibu dr. HirowatiAli, Ph.D sebagai ketua komisi pembimbing atas saran, arahan dan bimbingannya selama penelitian. Selanjutnya ucapan terima kasih penulis tujukan kepada Bapak Dr. Djong Hon Tjong, S.Si, M.Si. sebagai anggota komisi pembimbing yang telah memberikan saran dan kritik, sehingga penelitian ini dapat terwujud. Bantuan dari semua pihak, terutama dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Unand serta Laboratorium Patologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Unand, sangat dihargai.

DAFTAR PUSTAKA

- Putri CF dan Bactiar EW. 2020. *Porphyromonas gingivalis* dan patogenesis disfungsi kognitif: analisis peran sitokin neuroinflamasi. *Cakradonya Dent J.* 12(1): 15-23.
- Purba JS. 2020. Potensi terapi sel punca untuk penyakit Alzheimer: Kenyataan atau harapan ?. *CDK.* 47(1): 1-5.
- Dewin N dan Gondhowiardjo S. 2013. *Stem cell* pada kanker. *Journal of the Indonesian radiation oncology society.* 4(1): 4-7.
- Wibowo AP, Pramono BA dan Miranti IP. 2017. Korelasi luas area *Wharton's* jelly dengan luaran berat lahir bayi pada kehamilan cukup bulan. *Jurnal Kedokteran Diponegoro.* 6(2): 196-205.
- Paladino FV, Rodrigues J, Silva A and Goldberg AC. 2019. The Immunomodulatory potential of *Wharton's* jelly mesenchymal stem/stromal cell. *Stem Cell International.* 2019: 1-7.
- Kristianingrum YP, Widyarini S, Kurniasih, Sutrisno B, Tabbu CR dan Sugiyono. 2016. *Jurnal Sains Veteriner.* 34 (1): 84-91.
- Lykhmus O, Koval L, Voytenko L, Uspenska K, Komisarenko S, Deryabina O, Shuvalova N, Kordium V, Ustymenko A, Kyrk V and Skok M. 2019. Intravenously injected mesenchymal stem cells penetrate the brain and treat inflammation-induced brain damage and memory impairment in mice. *Frontiers in Pharmacology.* 10(355): 1-12.
- Abid NB, Naseer MI and Kim MO. 2019. Comparative Gene-Expression Analysis of Alzheimer's Disease Progression with Aging in Transgenic Mouse Model. *International Journal of Molecellar sciences.* 20: 1-14.
- Vania A, Simona L, Anke R, Hugo B, Dante C, Hugo Bes and Rey A. 2006. Expression of *IL-1 β* in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 407(2): 176-181.
- Chung KM, Jeong EJ, Park H, Kyu An H, Woon Yu S. 2016. Mediation of Autophagic Cell Death by Type 3 Ryanodine Receptor (*Ryr3*) in Adult Hippocampal Neural Stem Cells. 10: 116.
- Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M. 2017. Isolation and characterization of mesenchymal stem stromal cells

- from human umbilical cord and fetal placenta. *J Vis Exp.* 1-13.
12. Praveenkumar SE, Bairy KL, Nayak V, Reddy SK, Kiran A and Ballal A. 2019. Amelioration of Aluminium Chloride (AlCl₃) Induced Neurotoxicity by Combination of Rivastigmine and Memantine with Artesunate in Albino Wistar Rats. *Biomedical & Pharmacology Journal.* 12(2): 703-711.
 13. Louro LA, Valle CZ, Junior AJ, Santos GN, Gubert F, Figueiredo AB, Torres AL, Parades BD, Teixeira C, Moll FT, Otero RM and Santiago MF. 2014. Distribution of mesenchymal stem cells and effects on neuronal survival and axon regeneration after optic nerve crush and cell therapy. *Plos One.* 9(10): 1-16.
 14. Chen YC, Chang YW, Tan KP, Shen YS, Wang YH and Chang CH. 2018. Can mesenchymal stem cells and their conditioned medium assist inflammatory chondrocytes recovery. *Plos One.* 13(11): 1-16.
 15. Rivera LM, Castrillo SP, Fernandez ML, Fernandez JG, Gonzalez ME, Cosamalon JC and Suarez VV. 2017. Immunomodulation of mesenchymal stem cells in discogenic pain. *The Spine Journal.* 1-13.
 16. Gong S, Su BB, Tovar H, Mao C, Gonzalez V, Liu Y, Lu Y, Wang KS and Xu C. 2018. Polymorphisms Within *RYR3* Gene Are Associated With Risk and Age at Onset of Hypertension, Diabetes, and Alzheimer's Disease. *American Journal of Hypertension.* 31(7): 818-826.
 17. Supnet C, Grant J, Kong H, Westaway D and Mayne M. 2006. Amyloid- β -(1-42) Increases Ryanodine Receptor-3 Expression and Function in Neurons of TgCRND8 Mice. *The Journal of Biological Chemistry.* 281(50): 38440-38447.
 18. Brisac C, Francois T, Arnaud A, Isabelle P, Florence CG, Catherine B, Christophe L and Bruno B. 2010. Calcium flux between the endoplasmic reticulum and mitochondrion contributes to poliovirus-induced apoptosis. *Journal of Virology.* 84(23): 12226-12235.
 19. Fachrurrazy, Susiolwati R and Soejono SK. 2005. Perubahan jumlah sel purkinje cerebellum dan koordinasi motorik akibat pemberian alkohol pada tikus. *Berkala Neurosains.* 6(1): 27-36.
 20. Lee EJ, Nayra C, Diana A, Jacobo S, John S, Paola A, Yating P, Jordan B, Seyed N, Ana M and Mauricio R. 2020. Mesenchymal stem cells reduce ER stress via PERK-Nrf2 pathway in an aged mouse model. *Asian Pacific Society and Respiriology.* 1-10.
 21. Alicka M and Krzysztof M. 2018. The effect of chronic inflammation and oxidative and endoplasmic reticulum stress in the course of metabolic syndrome and its therapy. *Stem Cells International.* 1-14.