



KODE ARTIKEL : PPK-25-5-5-2

PENGARUH SUHU PENYIMPANAN HUMAN PLATELET LYSATE (HPL) TERHADAP KUALITAS PROLIFERASI KULTUR SEL PRIMER GINJAL MENCIT (Mus musculus)

Devani Dwita Indriani, Tuti Sri Suhesti, Gratiana Ekaningsih Wijayanti*, Diani Mentari

Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman

*email korespondensi : gratiana.wijayanti@unsoed.ac.id

ABSTRAK

Human platelet lysate (HPL) berpotensi sebagai alternatif dari Fetal Bovine Serum (FBS) untuk media kultur sel. HPL diproduksi dari Thrombocyte Concentrate (TC) berkualitas yang telah melewati masa simpan melalui siklus freeze thawing. Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh suhu penyimpanan HPL terhadap kadar glukosa dan protein total serta menentukan konsentrasi HPL yang efektif mendukung proliferasi kultur sel primer ginjal mencit. Penelitian ini dilaksanakan dalam 2 tahap. Pada tahap 1 diuji efek suhu (-20°C dan -80°C) dan lama penyimpanan HPL (1-4 minggu) terhadap kandungan glukosa dan protein total. Pada tahap 2 diuji efek HPL yang telah disimpan pada tahap-1 dengan konsentrasi masing-masing 5% dan 10% serta 10% FBS sebagai kontrol terhadap sel-sel ginjal mencit (*Mus musculus*). Kultur dilaksanakan selama 2 hari dalam DMEM yang mengandung serum uji, 5% penicillin-streptomycin, dan 0,5% fungizone. Variabel kultur berupa densitas, viabilitas dan morfologi sel. Penyimpanan HPL pada suhu -20°C dan -80°C tidak secara signifikan berpengaruh terhadap kadar glukosa namun menurunkan kadar protein total dalam HPL. Sel-sel ginjal mencit yang dikultur dalam medium dengan suplemen HPL 5% yang telah disimpan pada -80°C memiliki viabilitas tertinggi (83,13±2,71%) dan densitas tertinggi (2,0±0,5x10⁵ sel/mL). Sel hasil kultur memiliki bentuk bulat namun belum dapat diidentifikasi tipe sel secara spesifik. Berdasarkan kadar glukosa dan protein total kualitas HPL dapat dipertahankan pada suhu -20°C maupun -80°C. Proliferasi dan viabilitas sel-sel ginjal mencit tertinggi dapat diperoleh dengan menambahkan 5% HPL (yang telah disimpan pada -80°C) ke dalam medium kultur.

Kata kunci : Human Platelet Lysate, Proliferasi Sel Ginjal Mencit, Kultur Primer

PENDAHULUAN

Kultur sel dikembangkan sebagai metode dalam mempelajari sel hewan secara in vitro. Kultur sel dapat berupa kultur sel primer dan cell line. Kultur sel primer adalah sel, jaringan, organ yang diambil secara langsung dari organisme asal. Kultur primer mengacu pada fase kultur setelah sel diisolasi dari jaringan tubuh dan berkembang biak dalam kondisi yang sesuai. Kultur in vitro merupakan salah satu eksperimen yang digunakan dalam berbagai tes kesehatan, salah satunya adalah anti kanker. Kemajuan dalam kultur sel telah mempengaruhi peningkatan penggunaan Fetal Bovine Serum (FBS). FBS adalah suplemen nutrisi untuk kultur sel yang mengandung nutrisi penting seperti protein, growth factor (GF), lipid, karbohidrat, lemak, mikronutrien dan vitamin. Untuk mendapatkan FBS, sapi harus dibunuh (eutanasia) dan janin harus dibiarkan selama 10-20 menit sebelum diambil darahnya. Hal tersebut tidak hanya dikritik pada masalah etika dan kesejahteraan hewan. Oleh karena itu, dengan teknik tersebut karena peranannya yang penting dalam penelitian biologi dan produksi farmasi dapat menggunakan alternatif yaitu Human platelet lysate (HPL). HPL adalah bahan yang digunakan sebagai alternatif dari FBS, media yang digunakan untuk kultur sel (Oeller et al., 2021). HPL berasal dari Thrombocyte Concentrate (TC) dengan kualitas tinggi yang dikumpulkan atau disimpan selama 3-5 hari, dibuat dari TC melalui siklus pembekuan/pencairan secara berulang (Mentari, Pebrina dan Nurpratami, 2022). Glukosa merupakan sumber energi pada Trombosit. Sedangkan protein merupakan makromolekul yang memiliki kontribusi terhadap fungsi dan struktur sel. Masa penyimpanan seperti waktu dan suhu memiliki pengaruh secara statistik dan efek signifikan terhadap glukosa dan total



protein. Oleh karena itu diperlukan uji analisis pada parameter tersebut untuk mendapatkan HPL dengan kualitas yang baik. (Mentari et al., 2020; Mentari et al, 2022; Alberghina et al., 2013).

MATERI DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan Rancangan acak lengkap melalui pendekatan in vitro menggunakan organ ginjal mencit untuk menguji proliferasi sel menggunakan alternatif serum HPL yang dibandingkan dengan FBS. Penelitian menggunakan HPL yang terdiri dari konsentrasi 5% dan 10% dengan suhu penyimpanan -20°C dan -80°C. Penelitian dilakukan pada Januari 2024 hingga Agustus 2024.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Suhu terhadap Kadar Glukosa HPL

HPL disimpan beku pada suhu -20oC dan -80oC selama 1 bulan dengan pengamatan setiap minggu selama 4 minggu. Hasil pengukuran kandungan glukosa dalam HPL sebelum dilakukan penyimpanan dalam kondisi beku serta hasil pengukuran kadar glukosa dalam HPL yang disimpan pada suhu -20oC dan -80oC disajikan pada Tabel 4.1.

Tabel 1. Kadar Glukosa dalam HPL yang disimpan pada suhu -20oC dan -80oC selama 4 minggu.

| Waktu Penyimpanan | Konsentrasi Glukosa (mg/dL) | | Rerata± SD | |
|-------------------|-----------------------------|---------|-----------------------------|------------------------------|
| | -20°C | -80°C | -20°C | -80°C |
| 1. Minggu 0 | 600,946 | | | |
| | 543,533 | | 553,102±43,850 ^a | |
| | 514,827 | | | |
| 2. Minggu 1 | 202,594 | 432,664 | | |
| | 199,328 | 456,643 | 199,232±3,411 ^b | 444,988±10,682 ^b |
| | 195,773 | 442,657 | | |
| 3. Minggu 2 | 203,179 | 280,385 | | |
| | 217,604 | 225,962 | 229,339±33,603 ^b | 257,885±28,408 ^{bc} |
| | 267,237 | 267,308 | | |
| 4. Minggu 3 | 382,051 | 259,138 | | |
| | 287,879 | 246,612 | 302,098±73,877 ^b | 247,433±11,316 ^{bc} |
| | 236,364 | 236,550 | | |
| 5. Minggu 4 | 222,699 | 87,339 | | |
| | 226,86 | 125,577 | 229,004±7,607 ^b | 90,561±33,521 ^{bd} |
| | 237,453 | 58,768 | | |

Keterangan: notasi berbeda dibelakang nilai rerata±SD menunjukkan perbedaan(p<0.05)

Hal tersebut dapat dilihat bahwa kadar glukosa dalam HPL yang diamati setiap minggu berfluktuasi. Kadar glukosa dalam HPL pada kedua suhu penyimpanan diuji normalitas dan homogenitasnya. Hasil uji normalitas dan homogenitas kadar glukosa pada suhu -20°C dan -80°C menunjukkan data terdistribusi normal (p>0,05) dan homogen (p>0,5).

Selanjutnya dilakukan uji Anova satu arah pada kadar glukosa suhu -20°C dan -80°C. Hasil uji Anova satu arah pada kadar glukosa suhu -20°C dan -80°C menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan (p<0,05) pada kadar glukosa dalam HPL sebelum dan sesudah penyimpanan. Hasil uji Post-Hoc menunjukkan



bahwa kadar glukosa setiap minggu dalam HPL yang disimpan selama 4 minggu pada suhu -20°C tidak berbeda secara signifikan. Penyimpanan HPL pada suhu -80°C mengakibatkan penurunan kadar glukosa HPL. Guna mengevaluasi pengaruh suhu penyimpanan terhadap kadar glukosa HPL maka dilakukan uji "t"-test dependent. Hasil uji "t" menunjukkan bahwa secara keseluruhan kadar glukosa dalam HPL yang disimpan pada suhu -20°C tidak berbeda secara signifikan dengan kadar glukosa HPL yang disimpan pada suhu -80°C ($p>0,05$). Hasil analisis secara keseluruhan menunjukkan bahwa penyimpanan HPL pada suhu -20°C maupun -80°C mengakibatkan penurunan kadar glukosa. Hasil uji "t" yang tidak signifikan dapat diartikan bahwa HPL dapat disimpan baik pada suhu -20°C maupun -80°C .

Faktor yang kemungkinan berkontribusi terhadap perubahan kadar glukosa dalam HPL antara lain stabilitas suhu penyimpanan dalam freezer karena suhu freezer selama penelitian naik turun akibat freezer sering dibuka untuk pengambilan specimen dalam cuaca yang ekstrim. Reagen yang digunakan, dan prosedur pelaksanaan pengukuran juga dapat berpengaruh terhadap kadar glukosa dalam serum menurun. Penurunan kadar glukosa plasma selama penyimpanan pada suhu -20°C juga dilaporkan oleh Clark et al. (1990) namun peneliti tersebut belum dapat memastikan penyebab penurunan kadar glukosa selama penyimpanan. Semula Clark et al. (1990) menduga bahwa proses freeze-thawing secara berulang lebih berpengaruh terhadap penurunan kadar glukosa plasma dibanding lama waktu penyimpanan. Namun setelah dilakukan pengujian dengan berbagai metode diketahui bahwa freeze-thawing secara berulang maupun lama penyimpanan tidak secara signifikan berpengaruh terhadap penurunan kadar glukosa. Flood et al. (2002) melaporkan adanya peningkatan kadar glukosa dalam plasma sebesar 11,8% setelah satu siklus freeze-thawing namun pada penelitian tersebut tidak diinformasikan lama waktu penyimpanan.

Pengukuran kadar glukosa dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan metode glukosa-oksidas (GOD-PAP). Metode GOD-PAP sering digunakan dalam penelitian karena dianggap memiliki ketelitian yang lebih tinggi, sehingga memperoleh hasil yang lebih akurat. Dalam pemeriksaan menggunakan Metode GOD-PAP, glukosa dalam sampel dioksidasi menjadi asam glukonat dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida kemudian bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan indikator fenol, yang dikatalisis oleh enzim POD, membentuk quinonemine dan air (Subiyono et al., 2016).

Pengaruh Suhu terhadap Kadar Protein Total HPL

Hasil pengukuran protein total dalam HPL sebelum dilakukan penyimpanan dalam kondisi beku serta hasil pengukuran kadar protein dalam HPL yang disimpan pada suhu -20°C dan -80°C disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kadar Protein dalam HPL yang disimpan pada suhu -20°C dan -80°C selama 4 minggu



| Waktu Penyimpanan | Konsentrasi Protein (g/dL) | | Rerata± SD | |
|-------------------|----------------------------|-------|-------------|-------------|
| | -20°C | -80°C | -20°C | -80°C |
| 1. Minggu 0 | 4,598 | | | |
| | 4,372 | | 5,246±1,322 | |
| | 6,768 | | | |
| 2. Minggu 1 | 6,870 | 3,577 | | |
| | 7,108 | 5,177 | 6,978±0,120 | 5,059±1,426 |
| | 6,955 | 6,422 | | |
| 3. Minggu 2 | 4,8 | 6,333 | | |
| | 6,066 | 3,960 | 5,577±0,680 | 4,771±1,353 |
| | 5,866 | 4,019 | | |
| 4. Minggu 3 | 4,881 | 8,765 | | |
| | 5,592 | 6,808 | 5,296±0,370 | 7,695±0,991 |
| | 5,415 | 7,510 | | |
| 5. Minggu 4 | 5,390 | 4,716 | | |
| | 5,563 | 5,283 | 5,269±0,369 | 4,864±0,368 |
| | 4,855 | 4,592 | | |

Pada Tabel 2 tersebut dapat dilihat bahwa kadar protein dalam HPL yang diamati setiap minggu mengalami fluktuasi. Data kadar protein total dalam HPL diuji normalitas dan homogenitasnya. Hasil uji menunjukkan bahwa data kadar protein total dalam HPL terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji Anova satu arah terhadap kadar protein total HPL yang disimpan pada suhu -20°C dan -80°C . Hasil uji Anova menunjukkan bahwa kadar protein total dalam HPL yang disimpan pada suhu -20°C dan -80°C tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$). Hasil analisis tersebut mengindikasikan bahwa kadar protein total dalam HPL yang disimpan pada suhu -20°C dan -80°C relatif dalam kisaran yang stabil meskipun bervariasi antar minggu.

Pengukuran kadar protein dilakukan menggunakan uji biuret untuk mendeteksi protein karena metode ini dapat mengidentifikasi adanya ikatan peptida, yang ditunjukkan dengan perubahan warna ungu pada larutan sebagai hasil reaksi. Hasil uji biuret menunjukkan bahwa sampel mengalami perubahan warna menjadi ungu. Hal tersebut terjadi karena ion Cu^{2+} dari pereaksi biuret bereaksi dalam kondisi basa dengan polipeptida atau ikatan peptida yang membentuk protein, membentuk senyawa kompleks berwarna ungu (Putri et al., 2016).

Proliferasi Sel Ginjal Mencit

Proliferasi sel ginjal mencit dievaluasi dengan menghitung viabilitas dan densitas sel setelah 2 hari kultur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel ginjal mencit yang dikultur dengan penambahan HPL 5% dan HPL 10% yang disimpan pada suhu -20°C , HPL 5% dan HPL 10% yang disimpan pada suhu -80°C , FBS 10% (sebagai pembanding), dan medium kultur tanpa suplemen serum (sebagai kontrol) memiliki viabilitas di atas 80% (Tabel 4). Hasil uji Anova satu arah menunjukkan bahwa viabilitas sel ginjal mencit yang dikultur dalam medium dengan penambahan HPL, FBS, maupun tanpa serum tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$). Berdasarkan hasil uji tersebut dapat dikatakan bahwa HPL dengan konsentrasi 5% dan 10% baik disimpan pada suhu -20°C maupun -80°C mampu mendukung kehidupan sel ginjal mencit dalam kultur. Segeritz dan



Vallier (2017) menyatakan bahwa sel hasil kultur dengan viabilitas 80-95% dikategorikan sebagai sel yang sehat. Dengan demikian sel hasil kultur yang diperoleh dalam penelitian ini tergolong sebagai sel yang sehat. Tabel 3. Rerata Viabilitas Sel Ginjal Mencit yang dikultur dalam medium DMEM yang disuplementasi dengan FBS atau HPL, 5% penstrep, 0,5% fungizone pada suhu 37oC selama 2 hari

| Perlakuan | Viabilitas Kultur Sel (%) | |
|----------------|---------------------------|--|
| | Rerata±SD | |
| FBS 10% | 82,88±3,11 | |
| HPL 5% -20oC | 81,47±5,92 | |
| HPL 10% -20 oC | 80,63±2,79 | |
| HPL 5% -80 oC | 83,13±2,71 | |
| HPL 10% -80 oC | 81,71±3,91 | |

Hasil penelitian ini sejalan dengan Mohamed et al. (2020) yang menyatakan bahwa konsentrasi HPL sebesar 5% memiliki kemampuan yang sama dengan FBS 10% dalam mendukung pertumbuhan sel Vero dan Hep-2. Viabilitas sel dalam kultur dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain suhu, pH, ketersediaan nutrisi, dan kadar oksigen. Kondisi kultur yang sesuai menyediakan sumber daya yang dibutuhkan sel untuk tumbuh dan bertahan hidup. Viabilitas sel bergantung pada kemampuan sel untuk bertahan hidup dan melakukan proses metabolisme, yang merupakan faktor dalam menentukan keberhasilan kultur sel. Hal ini berpengaruh pada kemampuan sel untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diinginkan (Puspitasari et al., 2006; Thermo Fisher, 2020).

Densitas sel ginjal mencit didapatkan rata rata densitas dengan suhu -20oC memiliki nilai antara 144000 ± 30495,9 sel/mL hingga 166000 ±15165,7 sel/mL. Sedangkan pada viabilitas sel ginjal mencit dengan suhu -80oC memiliki nilai antara 200000 ± 55226,8sel/mL hingga 164000 ±16733,2 sel/mL (Tabel 4). Hasil uji densitas sel kultur primer ginjal mencit menunjukkan bahwa penambahan HPL dengan konsentrasi 5% dan 10% yang telah disimpan pada suhu -20oC dan -80oC mampu memacu pertumbuhan sel sehingga menghasilkan densitas sel yang lebih tinggi dibanding densitas sel yang dikultur dengan penambahan FBS10% (p <0,05). Meskipun demikian perbedaan yang signifikan antar perlakuan tidak teridentifikasi dengan uji BNT (p >0,05).

Tabel 4. Rerata Densitas Sel Ginjal Mencit yang dikultur dalam medium DMEM yang disuplementasi dengan FBS atau HPL, 5% penstrep, 0,5% fungizone pada suhu 37oC selama 2 hari

| Konsentrasi serum | Densitas Kultur Sel (sel/mL) | |
|-------------------|------------------------------|--|
| | Rerata±SD | |
| FBS 10% | 140000 ±15811,3 | |
| HPL 5% -20oC | 144000 ± 30495,9 | |
| HPL 10% -20oC | 166000 ±15165,7 | |
| HPL 5% -80 oC | 200000 ± 55226,8 | |
| HPL 10% -80 oC | 164000 ±16733,2 | |

HPL yang digunakan pada penelitian merupakan HPL yang diproduksi dari TC yang telah expired dengan kualitas yang telah memenuhi persyaratan yaitu TC memiliki warna kuning jernih dan memiliki swirling. Swirling merupakan pusaran yang terlihat pada komponen darah TC, pusaran terbentuk karena bentuk discoid dari trombosit. Swirling yang terdapat pada TC menunjukkan bahwa TC memiliki kualitas yang masih baik. (Bria et al., 2024). Swirling merupakan parameter yang digunakan untuk mengevaluasi kualitas konsentrat trombosit (TC). Swirling diamati dengan cara TC dihadapkan pada sumber cahaya sambil memutar wadah secara perlahan. Adanya swirling menunjukkan nilai pH berada dalam kisaran yang memadai (Tomas et al., 2009). TC yang digunakan dalam pembuatan HPL harus memiliki pH yang normal yaitu dengan pH



dengan kisaran 7,20 – 7,33 yang dikategorikan dalam kondisi sangat baik dan dapat ditoleransi. American Association of Blood Banks (AABB) tidak merekomendasikan trombosit dengan rentang pH <6,2 dan >7,4 digunakan untuk transfusi. Saat pH turun di bawah 6,0, terjadi perubahan bentuk ireversibel dan hilangnya viabilitas trombosit akibat pengaruh penurunan pH (<6,8) pada morfologi trombosit (Hermawan et al., 2023). Pada penelitian ini, TC yang digunakan berasal dari pendonor dengan golongan darah O dengan usia >50 tahun, hal tersebut berkaitan dengan stok yang tersedia pada UDD PMI Kota Yogyakarta.

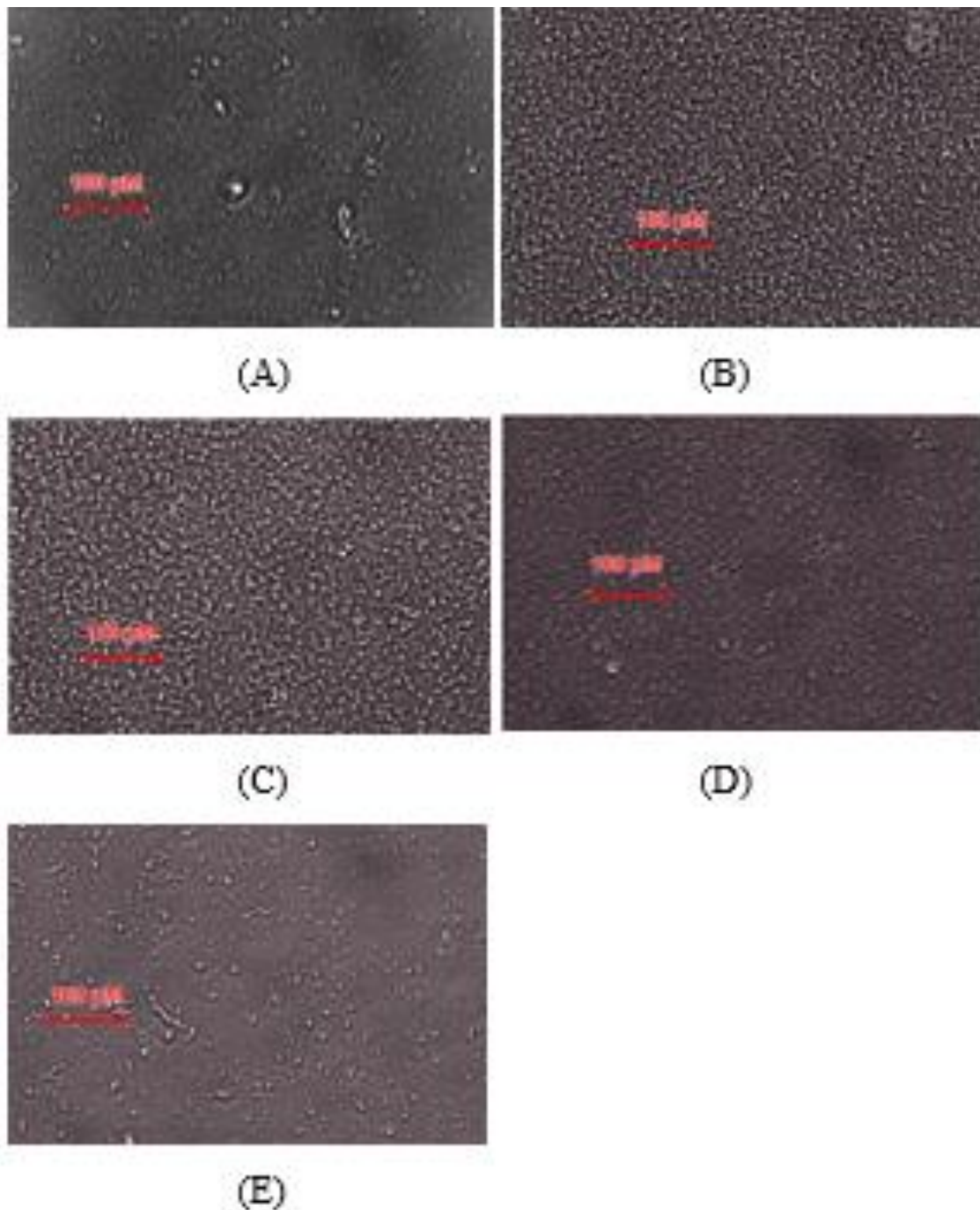
Glukosa dan protein adalah makromolekul yang memiliki peran terhadap fungsi dan struktur sel. Dalam penelitian Mentari et al. (2022), kadar glukosa darah dan total protein TC berkorelasi negatif sebelum dilakukan produksi HPL. Kadar total protein darah dipengaruhi oleh proses metabolisme. Protein dipecah menjadi asam amino melalui katabolisme. HPL memiliki kandungan protein yang lebih rendah dibandingkan dengan FBS, karena terdapat penghilangan albumin serum dan imunoglobulin selama proses persiapan. Tetapi HPL memiliki faktor pertumbuhan sel yang lebih baik dibandingkan dengan FBS. HPL merupakan produk yang memiliki kandungan konsentrasi tinggi dengan berbagai faktor pertumbuhan dan dapat berfungsi sebagai suplemen pertumbuhan dalam media kultur sel (Mohamed et al., 2020).

Menurut penelitian Mentari et al. (2023) semakin lama masa penyimpanan pada glukosa maka akan semakin rendah kadar glukosa. Glukosa yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan sel dan memperpanjang waktu penggandaan pada cell line T47D dan bersifat toksik pada cell line hGF normal. Selain itu, faktor pertumbuhan seperti VEGF, HGF, atau FGF2 tidak memicu peningkatan kadar glukosa. Kadar glukosa yang tinggi dapat mengaktifkan Protein Kinase C (PKC), menghambat oksidasi NADPH dan meningkatkan Spesies Oksigen Reaktif (ROS).

Morfologi Sel Ginjal Mencit

Morfologi sel pada sel ginjal mencit dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop inverted dengan perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan dengan beberapa perlakuan yang berbeda yaitu dengan medium yang mengandung suplemen HPL pada konsentrasi 5% dan 10% dengan suhu -20oC serta medium yang mengandung suplemen HPL dengan konsentrasi 5% dan 10% pada suhu -80oC, dan FBS 10%. Hasil pengamatan morfologi kultur sel pada perlakuan HPL dengan konsentrasi 5% dan 10% yang disimpan pada suhu -20oC menunjukkan bahwa sel berproliferasi dengan baik dan mencapai >80% konfluensi setelah dikultur selama 2 hari (Gambar 1). Konfluensi sel terjadi ketika sel yang dikultur melekat pada substrat dan berproliferasi sehingga menyebar dan memenuhi permukaan area kultur.

Sel yang dikultur dalam penelitian ini merupakan sel heterogen yang diperoleh dari hasil disosiasi jaringan ginjal. Evaluasi menggunakan mikroskop inverted menunjukkan morfologi sel yang relatif seragam dengan bentuk membulat dan melekat pada substrat (Gambar 4.6). Morfologi sel tersebut belum dapat dikategorikan ke dalam tipe sel yang dideskripsikan oleh Verma et al. (2020). Dengan demikian pada penelitian ini belum dapat dipastikan tipe sel yang mendominasi area kultur. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan metode tertentu misalnya flowcytometri untuk memastikan jenis dan karakter sel yang dihasilkan dalam penelitian ini.



Gambar 1. Morfologi Sel Ginjal Mencit pada Medium dengan Suplemen HPL serta FBS.

Keterangan: Gambar A = FBS 10%, B = HPL 5% suhu -20°C , C = HPL 10% suhu -20°C , D = HPL 5% suhu -80°C , E = HPL 10% suhu -80°C

Morfologi sel hasil kultur dapat bervariasi tergantung jenis sel yang dikultur. Verma et al. (2020) mendeskripsikan karakteristik beberapa morfologi sel setelah dikultur yaitu: (1) epitel, yang berbentuk poligonal dan tampak pipih saat melekat pada substrat dan membentuk lapisan tipis terus menerus (yaitu, satu lapis pada permukaan padat), (2) Tipe epiteloid, yang memiliki garis luar bulat dan tidak membentuk lembaran seperti sel epitel dan tidak menempel pada substrat; (3) Tipe fibroblas, yang berbentuk sudut dan memanjang dan membentuk jaringan sel terbuka daripada sel yang padat, bersifat bipolar atau multipolar, dan menempel pada substrat; dan (4) Jenis jaringan ikat, yang berasal dari jaringan fibrosa, tulang rawan, dan tulang, dan ditandai oleh sejumlah besar bahan ekstraseluler fibrosa dan amorf

SIMPULAN



Suhu penyimpanan HPL -20°C dan -80°C tidak berpengaruh terhadap kadar glukosa dalam HPL namun secara signifikan menurunkan kadar total protein dalam HPL. Penurunan kadar total protein dalam HPL yang disimpan pada suhu -20°C relatif sama dengan kadar protein total pada HPL yang disimpan pada suhu -80°C .

Berdasarkan viabilitas dan densitas sel diketahui bahwa proliferasi sel yang baik dalam kultur sel primer ginjal mencit (*Mus musculus*) dapat diperoleh dengan menambahkan 5% HPL yang telah disimpan pada suhu -80°C

DAFTAR PUSTAKA

- Alberghina, D., Casella, S., Giannetto, C., Marafioti, S. and Piccione, G. (2013) 'Effect of storage time and temperature on the total protein concentration and electrophoretic fractions in equine serum', *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 77, pp. 293-296.
- Andrew, K., McClain., and McCarrel, T. M. (2019) 'The Effect of Four Different Freezing Conditions and Time in Frozen Storage on the Concentration of Commonly Measured Growth Factors and Enzymes in Equine Platelet-Rich Plasma Over Six Months', *BMC Veterinary Research*, 15(292), pp. 1-9.
- Clark, M. L., Humphreys, S. M., and Frayn, K. N. (1990) 'Stability of plasma glucose during storage', *Ann Clin Biochem*, 27, pp. 373-377.
- Hermawan, D., Hayati, E., Durachim, A. And Noviar, G. (2023) 'Pengaruh Waktu dan Suhu Penyimpanan Trombosit Konsentrat terhadap Jumlah Trombsit', *Jurnal Kesehatan Siliwangi*, pp. 23-29.
- Mentari, D., Pebrina, R. and Nurpratami, D. (2022) 'Utilization of Expired Platelet Concentrate for Production of Human Platelet Lysate as a Medium for T47D Cell Propagation', *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, 6(2), pp. 96-103.
- Mohamed, H.E., Asker, M.E., Kotb, N.S. and Habab, A. M. E. (2020) 'Human platelet lysate efficiency, stability, and optimal heparin concentration required in culture of mammalian cells', *Blood Res*, 55, pp. 35-43.
- Oeller, M., Plumberger, S. L., Krisch, L., Rohde, E., Strunk, D. and Schallmoser, K. (2021) 'Human Platelet Lysate for Good Manufacturing Practice-Compliant Cell Production', *International Journal of Molecular Sciences*, 22, pp. 1-14.
- Puspitasari, I. I., Haryanti, S., and Prihastanti, E. (2006) 'Efektivitas Konsentrasi Sorbitol dalam Medium Purifikasi dalam Menghasilkan Jumlah Sel Viabel pada Isolasi Sel Mesofil Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)', *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 14(2), pp. 30-38.
- Putri, A. A. B., Yuliet., and Jamaluddin. (2016) 'Analisis Kadar Albumin Ikan Siidat (*Anguilla marmorata* dan *Anguilla bicolor*) dan Uji Aktivitas Penyembuhan Luka Terbuka pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)', *GALENKA Journal of Pharmacy*, 2(2), pp. 90 – 95.
- Thermo Fisher Scientifi. (2020) *Cell Culture Basic Handbook*. United States of America: Gibco.
- Tomas, L., Lindahl., and Ramstrom, S. (2009) 'Methods for evaluation of platelet function', *Transfusion and Apheresis Science*. 41(2), pp. 121-125. |