PENGARUH SUBPASASE DAN STARVASI SERUM FIBROBLAS SEBAGAI DONOR NUKLEUS PADA KEBERHASILAN PERKEMBANGAN SEL REKONSTRUKSI

Suatu Upaya Peningkatan Efisiensi Transfer Nukleus Sel Somatik dengan Teknik IDNI

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor

1407227

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
KEKHUSUSAN BIOMEDIK

PERPUSTAKAAN PUSAT
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
DES
616.079 7
SIS
p
2005
k.2

oleh

BUDI SISWANTO
NIM. 0003030042

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PROGRAM PASCASARJANA
MALANG
2005

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

	Halaman
PENGESAHAN	i
IDENTITAS TIM PENGUJI	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI	iii
RIWAYAT HIDUP	v
UCAPAN TERIMAKASIH	vi
RINGKASAN	x
SUMMARY	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1 : PENDAHULUAN	
1.1. Latar belakang	1
1.2. Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.4. Manfaat	7
BAB 2 : TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Kedokteran Regeneratif Masa Kini	9
2.1.1. *Stem cell*	9
2.1.2. Jalan Pintas terhadap *checkpoint* dari siklus sel	14
2.1.3. Produksi *cell graft*	18
2.1.4. Aplikasi Terapi Sel	22
2.1.5. Interaksi *host* dengan sel yang di implantasikan	26
2.2. Hubungan Kedokteran Regeneratif dan Transfer Nukleus	30
2.3. Transfer Nukleus	34
2.3.1. Sejarah Transfer Nukleus	34
2.3.2. Masalah Aplikasi Transfer Nukleus dalam Kedokteran.	36
2.3.3. *Reprogramming* dalam Transfer Nukleus	36
2.3.4. Kultur Sel Donor	38
BAB 3 : KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1. Kerangka Konsep Penelitian	39
3.2. Hipotesis Penelitian	42
3.3. Kerangka Operasional Penelitian	42
BAB 4 : METODE PENELITIAN	
4.1. Tempat dan Waktu	44
4.2. Bahan dan Alat	44
4.3. Metode Penelitian	45

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.4. Penelitian Pendahuluan: Pengaruh transfer nukleus sel somatik teknik insersi nukleus langsung ke intrasitoplasma pada viabilitas sel melalui integritas sel rekonstruksi

4.4.1. Pendahuluan 46
4.4.1.1. Latar Belakang 46
4.4.1.2. Perumusan Masalah 47
4.4.1.3. Tujuan Penelitian 48
4.4.1.4. Manfaat Penelitian 48

4.4.2. Kerangka konsep dan hipotesis 48
4.4.2.1. Kerangka konsep 48
4.4.2.2. Hipotesis 51

4.4.3. Metode Penelitian 52
4.4.3.1. Materi 52
4.4.3.2. Kerangka operasional 52
4.4.3.3. Metode 53
4.4.3.4. Peubah yang diamati 55

4.4.4. Hasil dan Pembahasan 55
4.4.4.1. Hasil 55
4.4.4.2. Pembahasan 57

4.4.5. Kesimpulan dan Saran 61
4.4.5.1. Kesimpulan 61
4.4.5.2. Saran 61

4.5. Penelitian tahap 1: Pengaruh subpasase dan starvasi serum terhadap derajat apoptosis fibroblas sebagai sumber nukleus donor dalam transfer nukleus sel somatik.

4.5.1. Pendahuluan 62
4.5.1.1. Latar Belakang 62
4.5.1.2. Perumusan Masalah 62
4.5.1.3. Tujuan Penelitian 63
4.5.1.4. Manfaat Penelitian. 63
4.5.1.5. Hipotesis 64

4.5.2. Metode Penelitian 64
4.5.2.1. Materi 64
4.5.2.2. Kerangka operasional 64
4.5.2.3. Metode 65
4.5.2.4. Peubah 68

4.5.3. Hasil dan Pembahasan 69
4.5.3.1. Hasil 69
4.5.3.2. Pembahasan 70

4.5.4. Kesimpulan dan Saran 73
4.5.4.1. Kesimpulan 73
4.5.4.2. Saran 73

4.6. Penelitian tahap 2 : Pengaruh derajat apoptosis sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil transfer nukleus sel somatik teknik IDNI (*Intracytoplasmic Direct Nuclear Injection*)

4.6.1. Pendahuluan 74
4.6.1.1. Latar Belakang 74
4.6.1.2. Perumusan Masalah 75
4.6.1.3. Tujuan Penelitian 76
4.6.1.4. Manfaat Penelitian 76
4.6.1.5. Hipotesis 77

4.6.2. Metode Penelitian 77
4.6.2.1. Materi 77
4.6.2.2. Kerangka operasional 78
4.6.2.3. Metode 78
4.6.2.4. Peubah 79

4.6.3. Hasil dan Pembahasan 79
4.6.4..1. Hasil 79
4.6.4..2. Pembahasan 81

4.6.4. Kesimpulan dan Saran 84
4.6.4..1. Kesimpulan 84
4.6.4..2. Saran 84

BAB 5 : HASIL DAN PEMBAHASAN UMUM

5.1. Hasil Umum 85
5.2. Pembahasan Umum 86

BAB 6 : KESIMPULAN DAN SARAN UMUM

6.1. Kesimpulan Umum 100
6.2. Saran Umum 100

DAFTAR PUSTAKA 101

LAMPIRAN 107

Repository Universitas Brawijaya

0500828

DISERTASI

PENGARUH SUBPASASE DAN STARVASI SERUM FIBROBLAS SEBAGAI DONOR NUKLEUS PADA KEBEHASILAN PERKEMBANGAN SEL REKONSTRUKSI

Suatu Upaya Peningkatan Efisiensi Transfer Nukleus Sel Somatik dengan Teknik IDNI

Oleh :

Budi Siswanto

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal : **8 Oktober 2005**
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Penasehat,

Prof. R. Prajitno Prabowo, dr,SpOG.
Promotor

Prof. Sutiman B. Sumitro, Drs.,SU.,DSc.
Ko - Promotor 1

Dr. Edi Widjajanto, dr.,MS.,SpPK(K)
Ko - Promotor 2

Ko - Promotor 3

Malang, 09 JAN 2006

Universitas Brawijaya
Program Pascasarjana
Direktur,

Prof. Dr. H. Djanggan Sargowo, dr, SpPD.,SpJP (K)
NIP. 130 531 873

PENGARUH SUBPASASE DAN STARVASI SERUM FIBROBLAS SEBAGAI DONOR NUKLEUS PADA KEBERHASILAN PERTUMBUHAN SEL REKONSTRUKSI. Suatu Upaya Peningkatan Efisiensi Transfer Nukleus Sel Somatik dengan Teknik IDNI

Nama Mahasiswa	: Budi Siswanto
NIM	: 0003030042
Program Studi	: Kedokteran
Minat	: Biomedik

KOMISI PROMOTOR

Promotor	: Prof. R. Prajitno Prabowo, dr., SpOG., KFER
Ko-promotor	: Prof. Sutiman B. Sumitro Drs. SU. DSc
Ko-promotor	: DR. Edi Widjajanto, dr. , MS., SpPK (K)

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1	: Prof. M. Aris Widodo. dr., SpFK., Ph.D
Dosen Penguji 2	: DR. Ir. Juliani Djuniarti., MS.
Dosen Penguji 3	: DR. M. Rasjad Indra, dr., MS

Tanggal Ujian	: 8 Oktober 2005
SK Penguji	:

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PERNYATAAN
ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 8 Oktober 2005

Mahasiswa

Nama: Budi Siswanto
NIM : 0003030042
PS : Kedokteran
PPSUB

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Karya ilmiah ini semoga mendapat ridho dari Allah S.W.T.

kupersembahkan kepada orang-orang yang tercinta

atas segala kasih sayangnya yang tulus

Yang tercinta

Ibunda dan Ayahanda Ibu Hj. Muridjem dan Ayah H. Sastrodimulyo (Alm)

Ibu dan Ayah mertua Ibu Hj Mardiyah dan Ayah H Makbul Thohir (Alm)

Isteriku Dra Hj Mufidah

Dan anak anakku, Iin, Ramacandra, Norma dan Puspita

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

RIWAYAT HIDUP

Budi Siswanto, Blitar, 8 Oktober 1955, anak dari ayah Sastrodimulyo (alm) dan ibu Muridjem. SD di Talun, Blitar. SMP di Wlingi, Blitar dan SMA di Blitar tamat tahun 1974. Studi di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, lulus dokter tahun 1982. Pengalaman kerja sebagai dokter Puskesmas dan Rumah sakit di Pacitan Jawa Timur mulai Februari 1983 sampai Desember 1989. Studi Spesialisasi Kebidanan dan Ilmu Penyakit Kandungan, Pendahuluan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan *Finishing* di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, lulus tahun 1996. Pengalaman kerja di RSU Maros Sulawesi Selatan 1997 sampai 1998. Bekerja di RSU Dr Saiful Anwar 1998 sampai sekarang.

Pengalaman penelitian utama sebagai teknisi RUT X, Produksi Embrio Kloning Kambing (2003-2005). **Ketua peneliti** PHB XIII, Metode *Intracytoplasmic Direct Nuclear Injection* (IDNI) untuk produksi sel totipoten sebagai graft (2005).

Malang, 8 Oktober 2005

Penulis

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT. Hanya karena Taufik dan Hidayah Nya, maka disertasi ini pada akhirnya dapat diselesaikan. Atas semua kerelaan, bantuan dan kerjasama yang baik selama ini disampaikan terimakasih kepada semua fihak. Secara khusus terimakasih yang sebesar besarnya tak lupa kami sampaikan kepada

Prof. R. Prajitno Prabowo, dr., SpOG. KFER selaku promotor, yang telah memberikan arahan strategis kepada penulis, dengan penuh kesabaran, keikhlasan dan kearifan, dalam melaksanakan penelitian dibidang transfer nukleus, sehingga penulis mempunyai gambaran yang jelas, arah perjuangan kemana yang perlu dituju dalam mengabdi mengamalkan ilmu untuk kemaslahatan umat, khususnya untuk kemaslahatan pasien pasien di masa mendatang.

Prof. Drs., Sutiman B. Sumitro, SU., DSc. selaku kopromotor, yang secara langsung telah membimbing dengan penuh ketelitian, kesabaran, keikhlasan dan membimbing bagaimana cara berfikir kritis dalam praktek sehari hari.

DR. Edi Widjajanto dr., MS., SpPK (K) selaku kopromotor yang telah banyak mendukung penelitian, membimbing, memberikan semangat dengan penuh kesabaran dan keikhlasan.

Prof. M. Aris Widodo. dr., SpFK., Ph.D., selaku dosen penguji sejak proposal sampai ujian terbuka dan sekaligus sebagai Ketua Program Doktor Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang. yang telah banyak memberikan masukan, semangat dan bimbingan.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DR. Juliani Dj Ir. MS., selaku dosen penguji sejak proposal sampai ujian terbuka yang telah banyak memberikan masukan, wawasan dan bimbingan.

DR. M. Sasmito Djati Ir. MS., selaku dosen penguji sejak proposal sampai seminar hasil penelitian, dan ujian terbuka, yang telah banyak memberikan masukan, wawasan dan bimbingan.

DR. M. Rasjad Indra, dr., MS selaku dosen penguji ujian tertutup, yang telah banyak memberikan masukan, wawasan dan bimbingan.

Prof. Tanaka Hozumi., DVM., PhD., yang telah memberikan ilmu dan ketrampilan yang dimiliki, bimbingan, arahan, dorongan belajar, kemurahan dan keikhlasan hati serta fasilitas dan bantuan lain yang tak ternilai harganya, selama bertugas di Malang sebagai tenaga ahli JICA maupun setelah kembali ke Japan, sehingga kami dapat mempraktekkan apa yang kami cita citakan.

Prof. Eimei Sato, Ph.D. Tohoku University, Japan, yang telah memberikan bimbingan yang sangat berarti, khususnya selama mengadakan workshop nuclear transfer di Lab FMIPA Biologi Universitas Brawijaya dan telah banyak memberikan advis dalam kunjungan ke laboratorium Biologi FMIPA Unibraw serta kunjungan ke Laboratorium swasta kultur sel di Sawojajar Malang

Ir. Gatot Ciptadi, DESS., yang karena pengalaman dan keahliannya telah banyak membantu memberikan support dalam penelitian ini, yang telah saling memberikan semangat pada saat saat diperlukan, dalam penelitian yang banyak menimbulkan gelombang naik dan turun dalam harapan dan keputusasaan. Terimakasih atas kerja samanya, semoga dapat menjadi tim yang dapat mengembangkan ilmu pengetahuan yang dibutuhkan masyarakat luas.

Drh. Arief Boediono, Ph.D, yang telah banyak memberikan masukan masukan, nasehat dan wawasan yang sangat membantu dan banyak berguna dalam melaksanakan penelitian.

DR Trinil Susilawati Ir. MS, atas segala bantuan dan dukungan yang diberikan serta fasilitasinya sehingga kami dapat mengenal secara pribadi. Prof. Tanaka Hozumi., DVM., PhD dan bisa mengikuti pelatihan transfer nukleus yang dibimbingnya.

Rektor Universitas Brawijaya Malang, Prof. DR. Ir. H. Bambang Guritno, yang telah memberikan kesempatan, untuk menempuh pendidikan dalam program doktor di Universitas Brawijaya.

Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang, Prof. DR. H. Djanggan Sargowo dr., SpPD., SpJP (K), beserta staf yang telah banyak memberikan kemudahan dan fasilitasi dalam penyelenggaraan pendidikan.

Direktur RSU Dr Saiful Anwar Malang, dr. Pawik Supriadi, SpJP (K), mantan direktur dr Tarbinu dan dr. Aman Ardjito Endarso, SKM., yang telah memberikan izin dan dispensasi untuk menempuh pendidikan dalam program doktor di Universitas Brawijaya.

Dr Imam Wahyudi, SpOG KFM, Mantan Kepala Laboratorium / SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSU Dr. Saiful Anwar Malang, yang telah memberikan rekomendasi dan memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan dalam program doktor ini.

Kepala Laboratorium Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSU Dr. Saiful Anwar Malang, dr Samodra Soeparman., SpOG, yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan dalam program doktor ini

Kepala SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSU Dr. Saiful Anwar Malang, dr Mulyohadi Sungkono, SpOG (K) yang

telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan dalam program doktor ini.

Kepala seksi Fertilitas Endokrinologi Reproduksi SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSU Dr. Saiful Anwar Malang, Prof. A. Hidajat, dr., SpOG., KFER, yang telah memberikan rekomendasi dan memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan dalam program doktor ini.

Terimakasih kepada yang tercinta Ibunda dan Ayahanda (Alm), Ibu dan Ayah mertua (Alm) yang telah memberikan restu, doa dan mendorong ketelatenan, kesabaran dengan penuh kearifan dan kasih sayang.

Terimakasih kepada keluarga, isteri Dra Hj Mufidah dan anak-anakku tercinta, Iin, Candra, Norma dan Puspita, yang telah menunggu dengan kesabaran dan memberikan dorongan untuk terus maju.

Semoga semua bantuan, dukungan dan kerjasama yang selama ini telah diberikan dengan ikhlas, mendapatkan balasan pahala dari Allah SWT. Amien.

Malang, 8 Oktober 2005

Penulis

Repository Universitas Brawijaya

RINGKASAN

BUDI SISWANTO. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya, Malang, Oktober 2005. Pengaruh subpasase dan starvasi serum fibroblas sebagai donor nukleus pada keberhasilan pertumbuhan sel rekonstruksi. Suatu upaya peningkatan efisiensi transfer nukleus sel somatik dengan teknik IDNI.
Komisi Pembimbing, Promotor : Prof. R. Prajitno Prabowo, dr., SpOG. KFER. Ko-promotor I.: Prof. Sutiman B. Sumitro Drs. SU. DSc. Ko-promotor II. : DR Edi Widjajanto dr., MSi SpPK (K)

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh subpasase dan starvasi serum fibroblas sebagai donor nukleus pada keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen laboratorium. Sel donor yang digunakan adalah fibroblas fetus kambing. Sitoplasma resipien yang digunakan adalah oosit kambing yang dilakukan maturasi *in vitro* pada tahap metafase II (MII) yang telah dilakukan enukleasi (Oosit enukleasi).

Penelitian dibagi menjadi dua tahap yaitu tahap pendahuluan dan tahap eksperimen. **Tahap pendahuluan** adalah optimalisasi prosedur Transfer nucleus sel somatic (TNS) teknik IDNI (*Intracytoplasmic Direct Nuclear Injection*). Tahap eksperimen terdiri dua tahap. **Tahap I** : Studi pengaruh subpasase (sel donor A) dan kultur starvasi serum (sel donor B) terhadap derajat apoptosis sel donor. **Tahap II** : Studi pengaruh derajat apoptosis sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Penelitian tahap pendahuluan menunjukkan bahwa IDNI dapat digunakan sebagai teknik TNS, melalui integritas sel rekonstruksi, yaitu sitoplasma yang diaspirasi sebanyak 10-25%, tidak ada lisis dan tidak degenerasi. TNS menggunakan sel donor subpasase, dari 72 sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi terjadi 12 (16,67%) pembelahan dan menggunakan sel donor starvasi serum, dari 68 sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi terjadi 7 (10,29%) pembelahan

Hasil penelitian tahap I menunjukkan bahwa subpasase 3 mempunyai persentase sel hidup yang masih baik (79.55 % ± 1,72), apoptosis dini 24,00 % ± 6,08 dan apoptosis lanjut 11,67 % ± 2,08. Kultur starvasi serum dari subpasase 3 pada hari ke 3 mempunyai persentase sel hidup yang masih baik (56.1 % ± 5.94), mengalami proses apoptosis dini 41,67 ± 2,08 dan apoptosis lanjut 42,33 % ± 7,57. Analisis statistik menunjukkan bahwa sistim kultur (subpasase dan starvasi serum) mempunyai asosiasi kuat dengan hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.

Penelitian tahap II menunjukkan bahwa dari 125 sel rekonstruksi menggunakan nukleus donor sel donor A terjadi pembelahan sel sebanyak 19 (15,2%) dan terjadi pertumbuhan 4-8 sel dan morula masing-masing ada 3 (0,8%). Dari 118 sel rekonstruksi menggunakan nukleus donor sel donor B terjadi pembelahan sel sebanyak 15 (12,7 %), terjadi pertumbuhan 4-8 sel sebanyak 7 (5,93%) dan tidak ada yang mencapai morula. Analisis statistik menunjukkan bahwa derajat apoptosis sel donor (hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut) mempunyai asosiasi kuat dengan perkembangan sel rekonstruksi.

Kata-kata kunci : Subpasase, starvasi serum, sel hidup, apoptosis, perkembangan.

Repository Universitas Brawijaya

SUMMARY

BUDI SISWANTO. Postgraduate Program Brawijaya University, October 2005. Influence of sub passage and serum starvation of fibroblast as nuclear donor to the development of reconstructed cells. An efford increase the efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer using Intracytoplasmic Direct Nuclear Injection Technique. Supervisor commission. Promoter R. Prajitno Prabowo. Copromotor I: Sutiman Bambang Sumitro. Copromotor II. : Edi Widjajanto.

The aims of this research are to study the influence of sub passage and serum starvation of fibroblast, as nuclear donor to successfulness of development of reconstructed cell. Research was done using laboratorial experimental design. Donor cell use goat fetal fibroblast. Cytoplasm recipient use enucleated oocyte of M-II stage matured in vitro.

Research was divided in two steps i.e. preliminary and experimental. Preliminary study was optimalization of SCNT (Somatic Cell Nuclear Transfer) using IDNI (Intracytoplasmic *Direct Nuclear Injection*) technique. The experimental was consisting of two steps. **The first step;** Studies the influence of sub passage (donor cell A) and serum starvation culture (donor cell B) to the degree of donor cell. **Second step;** The influence of the degree of donor cell to development of reconstructed cells produced by IDNI technique of SCNT.

Preliminary step of research showed that IDNI can be used as technique of SCNT via production of integrated reconstructed cells i.e. aspirated cytoplast is 10-25 %, no lyses and no degeneration. SCNT using sub passage and serum starvation cell as nuclear donor showed that 12 (16, 67%) of 72 activated reconstructed cells and 7 (10, 29%) of 68 activated reconstructed cells have cleaved

Results of first step showed that third sub passage still have good percentage of life cells (79.55 % ± 1, 72), early apoptotic was 24, 00 % ± 6, 08. and late apoptotic was 11,67 % ± 2,08. Serum starvation culture of third sub passage still have good percentage of life cells at third day (56.1 % ± 5.94), early apoptotic was 41, 67 ± 2, 08 and late apoptotic cell was 42, 33 % ± 7, 57. Statistical analysis showed that culture system (sub passage and serum starvation) has strong association with life, early apoptotic and late apoptotic donor cells.

Second step of research showed that 19 (15,2%) of 125 reconstructed cells using donor cell A have cleaved and 3 (0,8%) of 125 reconstructed cells using donor cell A was growth to 4-8 cell stage and morula. There are 15 (12,7 %) of 118 reconstructed cells using donor cell B cleave. There are 7 (5, 93%) of 118 reconstructed cells using donor cell B grow to 4-8 cell stage and there are no cell grow to morula. Statistical analysis showed that the degree of apoptotic (life, early apoptotic and late apoptotic) has strong association with development rate of reconstructed cell.

Key words: Sub passage, serum starvation, Life cell, apoptotic, development.

KATA PENGANTAR

Penelitian ini diawali dengan minat pada belajar ketrampilan transfer nukleus yang dilakukan di Jurusan Biologi Fakukultas MIPA UNIBRAW, dibimbing oleh tenaga ahli dari *JICA* (*Japan International Cooperation Agency*) Prof. Tanaka Hozumi., DVM., PhD. yang diselenggarakan pada tahun 2001 sampai Juni 2002. Berkat bimbingan, arahan dan dorongan belajar yang diberikan, meskipun tidak sedikit hambatannya, sekali lagi kami bersyukur kepada Allah SWT, kegiatan ini akhirnya bisa berlanjut untuk diselesaikan sebagai disertasi.

Hasil yang sangat diharapkan dalam jangka panjang adalah penelitian aplikasi selanjutnya dari penelitian ini dalam dunia kedokteran regeneratif, khususnya terapi penggantian sel (cell replacement therapy). Masih jauh memang harapan ini bisa terwujud, namun bagaimanapun jauhnya perjalanan, haruslah dimulai dari langkah pertama dan penelitian ini semoga menjadi langkah awal menuju arah yang dicita citakan dan diperlukan masyarakat.

Dalam tulisan ini disajikan tahapan penelitian yang secara garis besar terdiri dari dua tahap, tahap pendahuluan dan tahap eksperimental. Tahap eksperimental dibagi lagi menjadi tahap 1 dan tahap 2

1. Penelitian pendahuluan, untuk optimalisasi prosedur teknologi transfer nukleus sel somatik teknik *Intracytoplasmic Direct Nuclear Injection* (IDNI)
2. Tahap 1 penelitian pengaruh subpasase dan sartvasi serum terhadap kualitas sel somatik (derajat apoptosis) sebagai sumber nukleus donor dalam transfer nukleus
3. Tahap 2 mempelajari pengaruh derajat apoptosis sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil transfer nukleus sel somatik dengan teknik IDNI.

Tentunya dalam penelitian ini banyak kekurangan atau kekeliruan disana sini, karena keterbatasan pengetahuan dan ketrampilan penulis. Untuk itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun untuk perbaikan tulisan, agar dapat lebih bermanfaat

Malang, 8 Oktober 2005

Penulis

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 : Ringkasan studi klinis terapi sel untuk jantung.	24
Tabel 2 : Aplikasi Terapi sel menggunakan stem cell mesenchym pada model hewan	26
Tabel 3 : Aplikasi Terapi sel menggunakan stem cell mesenchym	27
Tabel 4 : Teknik transfer nukleus	35
Tabel 5 : Tingkat enukleasi, degenerasi dan insersi nukleus dengan teknik insersi langsung ke intrasitoplasma (IDNI)	55
Tabel 6: Tingkat pembelahan (cleavage) sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi	56
Tabel 7 : Kultur fibroblas dan jumlah sel hidup hasil kultur standard.	69
Tabel 8 : Sel hidup dari kultur standard subpasase 3 yang dilakukan starvasi serum	69
Tabel 9 : Apoptosis dini dan Apoptosis lanjut dari kultur sel donor	69
Tabel 10: Hasil analisis statistik asosiasi antara subkultur konfluen dan starvasi serum dengan karakter sel donor	70
Tabel 11: Aktivasi, pembelahan sel (cleavage) dan pertumbuhan sel rekonstruksi.	80
Tabel 12: Hasil analisis statistik asosiasi antara sistim kultur terhadap pembelahan dan perkembangan sel rekonstruksi	81
Tabel 13: Sistim kultur, karakteristik sel donor, pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TNS	85

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 01	: Potensi pertumbuhan sel ES *in vitro*	16
Gambar 02	: Strategi TN untuk menghasilkan jaringan otologus	32
Gambar 03	: Berbagai potensi aplikasi terapi mengunakan hES	33
Gambar 04	: Kerangka konsep dan hipotesis penelitian	39
Gambar 05	: Kerangka operasional penelitian	43
Gambar 06	: Kerangka konsep dan hipotesis penelitian	51
Gambar 07	: Kerangka operasional	53
Gambar 08	: Visualisasi dan konfirmasi enukleasi	56
Gambar 09	: Sitoplasma resipien	56
Gambar 10	: Sel rekonstruksi yang membelah	56
Gambar 11	: Skema posisi relatif kromatin terhadap polar bodi pertama	58
Gambar 12	: Arah kemiringan jarum	58
Gambar 13	: Kerangka operasional	65
Gambar 14	: Pewarnaan Hoechst 33342 dan PI	67
Gambar 15	: Metode penelitian	68
Gambar 16	: Fibroblas	70
Gambar 17	: Kerangka operasional	78
Gambar 18	: Pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi	80

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 01 : Daftar Singkatan 107

Lampiran 02 : Data enukleasi, Insersi nukleus (tabel 5) 109

Lampiran 03 : Pembelahan (Cleavage) sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi (tabel 6) 110

Lampiran 04 : Data persentase sel hidup dari Fibroblas fetus (tabel 7) 111

Lampiran 05 : Data persentase sel hidup dari Fibroblas Dewasa (tabel 7) 112

Lampiran 06 : Data persentase sel hidup dari Sel Starvasi Serum (tabel 8) 113

Lampiran 07 : Pemeriksaan Apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari kultur standard dan starvasi serum (tabel 9) 113

Lampiran 08 : Pemeriksaan apoptosis lanjut 114

Lampiran 09 : Pemeriksaan apoptosis dini. 115

Lampiran 10 : Aktivasi, pembelahan sel (*cleavage*) dan pertumbuhan sel rekonstruksi 116

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Setiap makhluk biologi (makhluk hidup), termasuk manusia sering mempunyai usia kehidupan lebih pendek dari rentang kehidupan (*life span*). Rentang kehidupan merupakan umur biologis maksimal yang bisa dicapai spesies tertentu. Rentang kehidupan adalah tetap (*fixed*) untuk masing-masing spesies (Speroff dan Fritz, 2005). Idealnya, kehidupan manusia bila ditinjau dari segi kesehatan, mempunyai usia harapan hidup (*life expectancy*) panjang (mendekati atau sama dengan rentang kehidupan) disertai mempunyai kualitas hidup yang optimal. Penyebab dari memendeknya harapan hidup dibanding dengan rentang kehidupan didominasi oleh (1) Faktor genetik. (2) Adanya kerusakan sel yang disebabkan oleh proses penuaan. (3). Faktor lingkungan dan (4) Faktor perilaku (*Life style*) (Speroff dan Fritz, 2005)

Selama ini upaya kesehatan difokuskan untuk menangani penyakit kronis yang mematikan (fatal). Dengan bertambah panjangnya harapan hidup, dalam dekade terakhir, mulai diperhatikan upaya penanggulangan penyakit-penyakit degeneratif akibat kerusakan sel pada proses penuaan. Penyakit-penyakit ini tidak fatal tetapi menurunkan kualitas hidup, contohnya adalah penyakit Alzheimer's, osteoporosis dll (Speroff dan Fritz, 2005). Dengan demikian fokus perhatian meluas ke segala penyakit yang tidak saja mematikan namun juga penyakit yang menurunkan kualitas hidup.

Respon dari tubuh manusia sebagai makhluk tingkat tinggi, dalam menghadapi kerusakan sel atau hilangnya sel akibat jejas, berbeda dengan proses dari spesies hewan multiseluler lain. Sebagai contoh, amfibi dapat mengembalikan sel yang telah terdifferensiasi yang mengalami kerusakan menjadi ke keadaan primitif untuk memulihkan jaringan yang hilang

(dedifferensiasi). Kemampuan membuat bagian tubuh yang hilang ini sudah tidak ada lagi pada manusia atau filum tingkat tinggi dalam metazoa lainnya. Namun demikian, pada manusia dan mammalia lainnya, untuk mengatasi kerusakan sel, masih ada cadangan populasi sel (*stem cell*) untuk membuat sel jenis tertentu dalam satu jaringan apabila dibutuhkan. *Stem cell* spesifik dari organ tertentu berperan dalam penggantian sel secara kontinu pada individu dewasa normal (Perpich, 2004; Tsai, 2004).

Kemajuan penelitian *stem cell* yang terjadi akhir-akhir ini akan membawa perubahan bermakna dalam praktek kedokteran. Banyak penyakit yang disebabkan oleh disfungsi atau kematian dari satu atau beberapa jenis sel, misalnya penyakit Parkinson dan Diabetes Mellitus *juvenille*. Pada penyakit demikian, terapi penggantian sel dengan memakai *stem cell* memberikan kemungkinan penyembuhan jangka panjang. *Stem cell* embrionik (SE) terbukti dapat transdifferensiasi ke jaringan lain. Dengan demikian, produksi SE dengan metode TNS (Transfer Nukleus Sel Somatik) membuka kesempatan untuk terapi penggantian sel dalam kedokteran regeneratif menjadi kenyataan (Perpich,. 2004; Tsai, 2004).

SE pertama dihasilkan dari embrio *mouse* (mencit) oleh ilmuwan-ilmuwan Cambridge dari Inggris. Teknik yang mereka kembangkan kemudian diadopsi oleh James Thomson dari *University of Wisconsin* untuk menghasilkan SE pertama kali pada manusia tahun 1998. SE adalah prekursor semua sel dalam tubuh. Ilmuwan sekarang mulai mencoba bagaimana mengarahkan differensiasi SE menjadi jenis sel atau jaringan yang diinginkan (Perpich, 2004). Dengan adanya hESC (*human embrionic stem cell*), terbuka kesempatan luas untuk dapat digunakan mengefektifkan upaya kesehatan. Transplantasi hESC berpotensi untuk memperbaiki fungsi jaringan yang mengalami disfungsi atau rusak akibat berbagai macam penyakit (Reubinoff, 2004).

Untuk sampai pada tahapan aplikasi klinis terapi penggantian sel, masih diperlukan banyak penelitian tentang *stem cell* . Hal hal yang menjadi masalah antara lain masalah rejeksi tubuh terhadap SE, terjadinya tumor teratoma atau differensiasi sel ke arah yang tidak diinginkan. (Bongso dan Richards, 2004; Reubinoff, 2004). Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah terapi penggantian sel, khususnya barier imunologis berupa rejeksi tubuh adalah teknologi transfer nukleus (TN). TN kemungkinan dapat dipakai untuk memproduksi SE dari blastosis hasil TN. SE dari hasil TN ini dapat diarahkan / diinduksi menjadi tipe sel tertentu yang dibutuhkan untuk terapi penggantian sel (terapi sel *graft* dari otologus).

Nilai penting dari penelitian ini adalah bahwa apabila nantinya dapat berhasil diproduksi *graft* berupa sel *graft* dengan metode TN, maka sel *graft* tersebut merupakan *graft* yang sesuai (*match*) terhadap pasien sehingga dapat mencegah rejeksi tubuh dan tidak lagi memerlukan imunosupresi. Namun hal tersebut saat ini masih dalam status tahap penelitian. Dalam rangka untuk penyediaan sumber sel untuk terapi, penelitian tidak dapat secara langsung dilakukan pada embrio manusia (Koh dan Atala, 2004; Henningson *et al.,* 2003; Eiges dan Benvenisty, 2002; Strom *et al.,* 2001) Karena itu penelitian ini merupakan penelitian laboratorium tentang TN yang menggunakan model hewan coba.

Produksi *stem cell* melalui TNS masih ada masalah. Masalah utamanya adalah efisiensi TNS yang masih rendah (Inefisiensi). Penyebab dari inefisiensi TNS terutama adalah disebabkan oleh *reprogramming* nukleus somatik yang diinsersikan ke dalam sitoplasma dalam TNS yang masih rendah (Wolf *et al.,* 2001). *Reprogramming* nukleus somatik, yaitu perubahan sel somatik yang telah terdifferensiasi menjadi sel yang totipoten kembali, diperlukan oleh sel rekonstruksi hasil TNS untuk dapat membelah dan tumbuh normal. Indikator dari

reprogramming yang normal dapat diketahui dengan marker pluripotensi sel yaitu adanya ekspresi oct-4 dan GCAP (Germ Cell Alkaline Phosphatase) dari mRNA (messenger ribonucleic acid) yang merupakan marker pluripotensi dari sel manusia dan mencit (Hansis *et al.,* 2004). Keberhasilan *reprogramming* sel somatik juga bisa dinilai dari keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi berikutnya (Dean *et al.,* 2003). Dengan demikian, mengetahui faktor-faktor yang berpengaruh pada keberhasilan TNS, sangatlah penting untuk meningkatkan efisiensi TNS, khususnya yang terkait dengan preparasi dan produksi sel donor.

1.2. Masalah

TNS adalah menginsersikan sebuah nukleus dari sel somatik ke ruang perivitellin sebuah sel telur yang kromosomnya telah dihilangkan (oosit enukleasi) selanjutnya difusi, dan dihasilkan sel rekonstruksi untuk ditumbuhkan *in vitro* sampai stadium blastosis. Insersi sel donor ke dalam ruang perivitellin oosit enukleasi, dapat dilakukan dengan *micro movement* (*Piezoelectric impact Drive Mechanism*) dan selanjutnya fusi sel dilakukan dengan memberi aliran listrik (Tsukada *et al.,* 2001).

Diharapkan, perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS adalah terbentuknya sel rekonstruksi dengan *genome* yang fungsional. Hal ini berarti akan terjadi pembentukan satu struktur kromatin yang mampu melakukan transkripsi dan translasi, sehingga memungkinkan adanya ekspresi gen pada sel yang mampu mengalami differensiasi ditempat dan dalam waktu yang tepat. Salah satu tantangan dari sel rekonstruksi hasil TN adalah menekan ekspresi somatik dan mengaktifkan ekspresi sel embrionik secara tepat. Walaupun pola metilasi dan ekspresi gen sel somatik ada yang masih bekerja, banyak sel rekonstruksi hasil TN yang dapat berkembang sampai blastosis. Salah satu faktor yang menentukan variasi ekspresi gen dan pola metilasi sel rekonstruksi hasil TN adalah sel sumber nukleus donor (Jouneau dan Renardy, 2003).

Sebelum dipakai sebagai sumber nukleus dalam TNS, sel donor perlu dilakukan subpasase untuk meningkatkan keberhasilan TN. Dalam subpasase, sel yang mempunyai kualitas jelek tidak tumbuh. Sel yang mempunyai kualitas baik dapat tumbuh normal (Hozumi, 2001). Dengan demikian subpasase mempunyai fungsi seleksi sel yaitu hanya sel-sel yang baik saja yang dapat tumbuh untuk selanjutnya dipakai sebagai sumber nukleus donor dalam TNS. Selain fungsi seleksi, subpasase juga mempunyai fungsi untuk memperbanyak

ketersediaan (jumlah) sel. Dengan subpasase, beberapa sel donor dapat diperbanyak jumlahnya berlipat ganda. Selain subpasase, sebelum dipakai sebagai sumber nukleus dalam TNS, sel donor juga perlu dilakukan kultur starvasi serum untuk menginduksi sel donor menjadi sel *quiscent* (sel fase G0/G1). Sel donor fase G0/G1 dapat meningkatkan angka keberhasilan TNS (Campbell *et al.,* 1996; Wilmut *et al.,* 1997 , Yu *et al.,* 2003., Urakawa *et al.,* 2004).

Selama ini kultur sel donor mempengaruhi kualitas sel. Jumlah subpasase dan lama kultur sering menyebabkan perubahan-perubahan genetik dan perubahan proses fisiologi sel. Penelitian ini ingin mempelajari masalah apoptosis yang ditimbulkan karena subpasase dan starvasi serum sel donor, selanjutnya mempelajari pengaruh derajat apoptosis pada perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik insersi nukleus langsung ke intrasitoplasma (IDNI = *intracytoplasmic direct nuclear injection*). Masalah yang ingin diketahui dalam penelitian TN menggunakan sel somatik fibroblas sebagai nukleus donor ini adalah

a. Apakah pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus pada derajat apoptosis sel donor.
b. Apakah pengaruh derajat apoptosis sel donor nukleus pada perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Secara spesifik, masalah penelitian adalah

a. Apakah pengaruh jumlah subpasase sel donor nukleus pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
b. Apakah pengaruh hari (lamanya) starvasi serum sel donor nukleus pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
c. Apakah pengaruh derajat apoptosis sel donor (sel hidup, sel apoptosis dini, sel apoptosis lanjut) pada ada tidaknya pembelahan (cleavage), dan tingkat perkembangan (4-8 sel, morula, blastosis) dari sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah untuk memproduksi *stem cell* sebagai bahan *graft* untuk terapi penggantian sel, yang tidak direjeksi oleh tubuh, karena mempunyai gene yang sama (*stem cell* yang singeneik). Teknologi yang dipakai untuk mencapai hal tersebut adalah teknologi TNS. Namun saat ini TNS mempunyai efisiensi yang masih rendah. Salah satu faktor penentu keberhasilan TNS adalah faktor sel donor. Tujuan penelitian adalah

1.3.1. Tujuan umum

a. Mengetahui pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus pada derajat apoptosis sel donor.
b. Mengetahui pengaruh derajat apoptosis sel donor nukleus pada perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

1.3.2. Tujuan khusus

a. Mengetahui pengaruh jumlah subpasase sel donor nukleus pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
b. Mengetahui pengaruh hari (lamanya) starvasi serum sel donor nukleus pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
c. Mengetahui pengaruh derajat apoptosis sel donor (sel hidup, sel apoptosis dini, sel apoptosis lanjut) pada ada tidaknya pembelahan (*cleavage*), dan tingkat perkembangan (4-8 sel, morula, blastosis) dari sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

1.4. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah

1.4.1. Manfaat Praktis

a. Hasil penelitian merupakan langkah awal untuk pengembangan teknik produksi *stem cell* yang singeneik untuk keperluan terapi penggantian sel.

b. Langkah lanjutan dari penelitian ini untuk menuju tujuan jangka panjang antara lain kultur sel rekonstruksi hasil TNS untuk memproduksi blastosis, produksi *stem cell* dari blastosis (inner cell mass), uji aplikasi pada hewan coba dan uji klinis

c. Data penelitian dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk meningkatkan efisiensi teknik TN

1.4.2. Manfaat Teoritis

Data penelitian merupakan informasi dasar yang penting untuk menelaah derajat degenerasi DNA pada peristiwa apoptosis dalam proses *reprogramming* DNA nukleus sel dalam perkembangan sel rekonstruksi. Hal ini akan mendasari perkembangan teknologi pemakaian *stem cell* untuk kepentingan terapi dibidang kedokteran regeneratif.

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kedokteran Regeneratif Masa Kini

2.1.1 Stem cell

Organisme multiseluler telah terjadi evolusi perubahan proses untuk mengatasi hilangnya sel akibat jejas (*injury*). Sebagai misal, amfibi dapat mengembalikan sel yang telah terdifferensiasi menjadi ke keadaan primitif untuk memulihkan jaringan yang hilang (dedifferensiasi). Kemampuan membuat bagian tubuh yang hilang ini sudah tidak ada lagi pada filum di atas metazoa. Tetapi pada mammalia masih ada cadangan populasi sel (*stem cell*) untuk membuat sel jenis tertentu dalam satu jaringan. *Stem cell* spesifik dari organ tertentu berperan dalam penggantian sel secara kontinu pada individu dewasa normal. Ada kenyataan bahwa berbagai organ tertentu seperti otak dan retina dewasa, terdapat *stem cell* di dalamnya namun kemampuan regeneratifnya tidak diketahui. Hal tersebut ditambah kemungkinan sel somatik dapat transdifferensiasi ke jaringan lain membuka kesempatan untuk terapi penggantian sel dalam kedokteran regeneratif (Tsai, 2004).

Kemajuan penelitian *stem cell* yang terjadi akhir akhir ini akan membawa perubahan bermakna dalam praktek kedokteran. Banyak penyakit seperti Parkinson dan Diabetes Mellitus juvenille terjadi karena disfungsi atau kematian dari satu atau beberapa jenis sel. Terapi penggantian sel akan memberikan kemungkinan penyembuhan jangka panjang. Beberapa terobosan besar dasawarsa yang lalu memberikan harapan bahwa terapi penggantian sel dapat menjadi kenyataan (Perpich, 2004).

Penelitian SE memang masih belum berkembang (*infancy*), namun sudah ada terobosan-terobosan, misalnya menumbuhkan neuron dopamin dari *stem cell* mencit dalam cawan petri kemudian ditransplantasikan ke mencit yang

mempunyai kerusakan otak mirip penyakit Parkinson. Sel-sel ini bisa memperbaiki fungsi motorik mencit. Masih ada banyak masalah keilmuan (*scientific*) dan medis yang harus diatasi dalam teknologi *stem cell* embrionik sebelum dapat dipakai oleh pasien. Juga banyak masalah sosial dan etik yang apabila tidak diperhatikan akan mengubur berkembangnya keilmuan. Hal ini bukan barang baru dalam ilmu biomedik. Ketika banyak pertanyaan tentang aspek keamanan dan aspek moral tentang teknologi DNA rekombinan pada tahun 1970 an, akhirnya dapat diyakinkan bahwa penelitian sesuai dengan standard keilmuan dan etika. Mekanisme yang sama akan dapat memecahkan kontroversi dalam kedokteran regeneratif (Perpich, 2004).

Pada dasarnya sel-sel dalam tubuh manusia ada tiga macam kelompok sel yaitu sel germinativum (germ cell), sel somatik dan *stem cell*. Sel somatik adalah sel yang menyusun sebagian besar tubuh dan masing-masing telah berdifferensiasi kecuali satu sel yang tidak berinti yaitu sel darah merah. Sel germinativum adalah sel-sel yang akan menjadi oosit dan sperma (gamet). *Stem cell* adalah sel yang mempunyai kemampuan tak terbatas untuk membelah dalam kultur dan mempunyai potensi menjadi sel khusus yang dewasa (*mature specialized cell type*). Bila *stem cell* membelah dapat menjadi sel terdifferensiasi atau memperbanyak diri tetap menjadi *stem cell* sehingga secara konstan memulihkan cadangan *stem cell* dalam organ (Bongso dan Richards 2004).

Stem cell dapat diklasifikasikan sebagai totipoten, pluripoten dan multi poten. Totipotensi adalah kemampuan untuk membentuk semua jenis sel dari hasil konsepsi, meliputikeseluruhan fetus dan plasenta. Sel totipoten mempunyai kemampuan tak terbatas, mampu membentuk organisme utuh. Embrio mammalia stadium dini adalah sekelompok sel totipoten. Pluripotensi adalah kemampuan untuk membentuk beberapa tipe sel dari ketiga lapisan germinativum (ektoderm, mesoderm dan endoderm), tetapi tidak dapat

membentuk organisme utuh. Sel pluripoten ada tiga klas yaitu SE, sel EG (*embryonic germ cell*) dan sel EC (*embryonic carcinoma cell*). Akhir-akhir ini ditemukan klas keempat dari sel pluripoten yaitu *multipotent adult progenitor cell* dari sumsum tulang. Multipotensi adalah kemampuan terbatas untuk menjasi sel dan jaringan yang sesuai dengan lokasinya, misalnya *stem cell* darah menjadi sel darah merah, lekosit dan trombosit (Bongso dan Richards, 2004).

Ada dua sumber utama sel untuk regenerasi jaringan yaitu SE dan *stem cell* dewasa (AS, *Adult tissue derived stem cell*) (Colman, 2004; Okamoto dan Watanabe, 2003). SE yang diambil dari embrio sedang tumbuh pada penelitian *in vivo* berpotensi tumbuh menjadi teratoma. Pemakaian SE untuk aplikasi dalam terapi penggantian sel masih memerlukan pemecahan beberapa masalah etik dan teknik (Okamoto dan Watanabe, 2003).

AS meliputi berbagai *stem cell* spesifik jaringan. Diantaranya adalah sel-sel sumsum tulang, yang telah banyak diteliti dan mempunyai pluripotensi dapat berdifferensiasi ke berbagai jenis sel diluar sel darah. Laporan lain menduga bahwa beberapa sel sumsum tulang yang dikultur *in vitro* mempunyai pluripotensi yang hampir sama dengan SE tetapi tidak menghasilkan teratoma. Namun laporan lain memberikan hasil pluripotensi yang berbeda, sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat dikonfirmasi dan dimengerti dengan baik (Okamoto dan Watanabe, 2003). Laporan terbaru menunjukkan bahwa sel lemak (*adipose tissue derived cell* = ADC) dapat dipakai untuk memperbarui kalvarium (bagian atas tulang tengkorak / *skull*) yang rusak (Brian *et al.*, 2005). Penelitian *in vivo* pada tikus (rodent), AS dapat berperan pada proses penyembuhan pada hampir semua kelainan jaringan dan organ (Conrad dan Huss 2005).

AS dapat diisolasi dari berbagai jaringan dan secara umum dikatakan potensi differensiasinya merupakan lingkungan lokalnya. AS tidak mempunyai

karakteristik spesifik jaringan, namun dibawah pengaruh rangsangan yang cukup dapat berdifferensiasi menjadi sel-sel spesifik dengan fenotip yang berbeda dengan prekursornya. Hal ini kemungkinan dikarenakan bahwa AS merupakan cadangan dari sel-sel untuk reparasi, yang siap untuk dimobilisasi dan berdifferensiasi sebagai respon terhadap rangsang luka atau penyakit (Barry dan Murphy 2004). Saat ini masih sedikit informasi yang tersedia tentang biologi populasi *stem cell* endogen pada orang dewasa dan peranan persisnya pada reparasi jaringan atau regenerasi. Hal ini antara lain disebabkan oleh tidak adanya marker sel yang spesifik. Yang sudah jelas adalah sel AS dapat diisolasi dan dikembangkan dalam kultur sampai banyak generasi dan tetap mempunyai kapasitas berdifferensiasi. Kemajuan dalam isolasi dan karakterisasi akhir akhir ini telah menuju pada pengembangan dan penilaian strategi terapi pada aplikasi klinik (Barry dan Murphy, 2004). Jaringan lemak baru-baru ini dilaporkan mengandung *stem cell* multipoten yang dapat berdifferensiasi ke beberapa jenis sel, antara lain lemak, osteoblas, mioblas dan kondroblas (Rodriguez *et al.,* 2005).

Dengan kemajuan teknik kultur sel akhir akhir ini seseorang dapat mengisolasi dan mengembangkan sel-sel yang diambil dari berbagai jaringan pada kondisi tertentu. Pendekatan ini telah menunjukkan adanya potensi yang tidak diharapkan bila kondisi kultur tidak sesuai dengan lingkungan alamiahnya. Temuan baru ini menentang konsep tradisional dari *stem cell* yang didefinisikan mempunyai kemampuan regeneratif dan repopulasi. Definisi status *stem cell* (*stem cell state*) atau *stemness* suatu status sel yang unik yang hanya dipunyai *stem cell*, diantaranya adalah dapat proliferasi memperbanyak diri terus menerus (*continuous self-renewing proliferation*) dan multipotensi atau pluripotensi (Tsai, 2004). Belum jelas apakah sifat *stem cell* ini merupakan satu set rancangan spesifik untuk *stem cell* (*a set of machinery specifically tailored for stem cell*) atau

merupakan kombinasi tertentu (unik) dari *pathway* molekuler yang bila sendirian (tidak kombinasi) bukan spesifik *stem cell*. Satu cara untuk mengetahui sandi status *stem cell* adalah didasarkan pada rasional bahwa ekspresi dari gene menggambarkan fungsinya. Berdasarkan rasional tersebut, beberapa penelitian telah melaporkan adanya petanda molekuler bersama dari tiga macam *stem cell* yaitu SE, HSC (*hematopoietic stem cell*) dan *stem cell* saraf (*neural stem cell*, NSC) dan petanda molekuler tersebut sudah tidak ada pada progeninya yang telah berdifferensiasi (Tsai, 2004).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gene-gene bersama (shared) dari SE, HSC dan NSC ternyata tidak hanya di ekspresikan secara khusus pada *stem cell*. Penelitian ini konsisten dengan ide bahwa petanda unik dari *stem cell* adalah terdiri dari kombinasi spesifik dari ekspresi gene dan bukan ekspresi gene yang spesifik. Dengan lain perkataan, ada kombinasi spesifik ekspresi gen dan bukan gen spesifik *stem cell* (Tsai, 2004)

Berbagai kenyataan menunjukkan bahwa sekali kompartemen *stem cell* terbentuk di dalam jaringan, disana akan tetap ada *stem cell* dalam jangka lama. Apa yang mempertahankan *stem cell* dalam *niche*-nya ?. Penelitian dalam *Drosophila* GSC (germ stem cell) menunjukkan bahwa interaksi fisik secara langsung antara *stem cell* dan sel-sel tetangga sekitar *non stem cell* di *niche* adalah penting untuk mempertahankan kompartemen khusus ini tetap ada *stem cell*-nya dan untuk mempertahankan karakter *stem cell* (Fuchs *et al.*, 2004).

Kemampuan *stem cell* untuk tetap berada dalam *niche* mempunyai fenomena yang konservatif (*conserved*) dalam evolusi dan dengan demikian dasar-dasar molekuler dari *stem cell* adalah secara luas tetap berlaku pada kingdom eukariotik maupun bukan eukariotik. (Fuchs *et al.*, 2004).

Niche selain mampu mempertahankan *stem cell* mungkin juga berperan dalam merekrut *stem cell*, yaitu suatu proses yang disebut *homing*. Meskipun

proses molekuler secara rinci belum diketahui, nampaknya *niche* tumbuh secara serentak bersama dengan *stem cell* dan jaringan sekitarnya. Begitu sudah terbentuk *niche*, tampaknya *niche* dapat tetap bertahan minimal sebagai pusat *signal* untuk menarik *stem cell* (Fuchs *et al.,* 2004). Beberapa contoh adalah sebagai berikut. Pada vertebrata, HSC yang di transplantasikan dari hewan dapat mencari jalan menuju sumsum tulang yang telah diradiasi. Penelitian pada *Drosophila* juga menunjukkan bahwa jika *niche* GSC dicoba dikosongkan dari isi GSC nya, *niche* masih tetap ada dan bahkan dapat memberi *signal* pada *stem cell* somatik yang datang untuk dapat tinggal dan mempertahankan beberapa sifat (*feature*) *stem cell* nya. Meskipun matrik ekstraseluler dan molekul adesi sel-sel dalam *niche* merupakan parameter penting dalam membantu *stem cell* menemukan jalan mencari *niche*, prosesnya mungkin juga di regulasi secara aktif melalui rangkaian *signal* molekul yang lebih panjang. Pada vertebrata hal ini penting terutama sewaktu ada inflamasi pada jejas dan terjadi rangsangan respon luka pada jaringan (Fuchs *et al.,* 2004).

2.1.2. Jalan Pintas terhadap *checkpoint* dari siklus sel.

Apakah suatu sel mengalami proliferasi dan differensiasi (keluar dari siklus sel), dikendalikan oleh banyak protein termasuk diantaranya melibatkan beberapa *pathway* dari *signal*, seperti *cyclin*, cdk (cyclin-dependent kinase), cdk inhibitor, dan *gene·supresor tumor*. Pengendalian (*checkpoint*) dari siklus sel dapat terjadi di transisi fase G1-ke-S atau fase G2-ke-M. Agar siklus sel tetap berlangsung, *checkpoint* ini perlu diinaktivasi (Tsai, 2004).

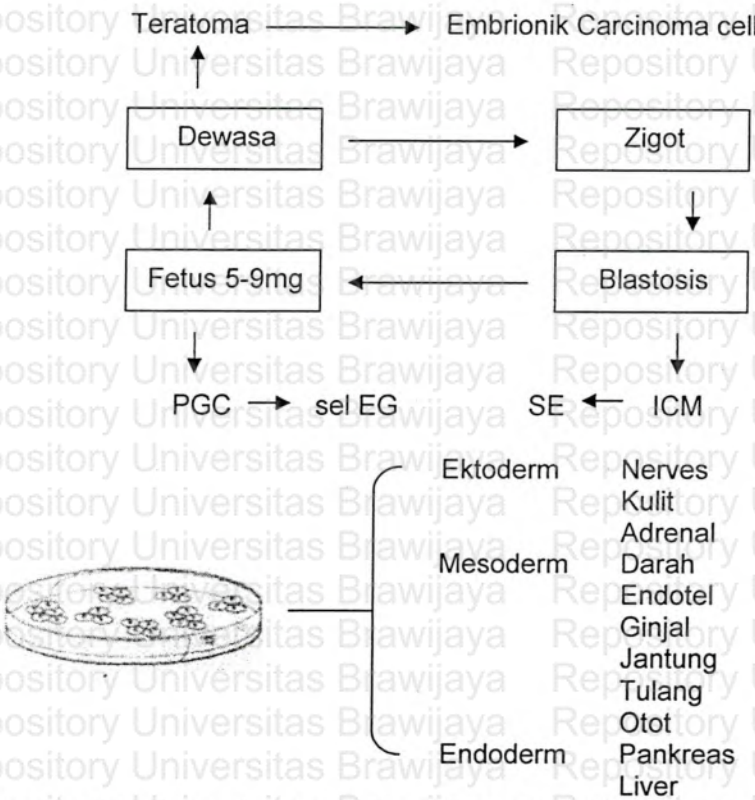
SE mempunyai fase G1 dan G2 sangat pendek. Profil siklus sel dari sel embrionik dini dan sel somatik adalah berbeda. Ekspresi protein-protein pengendali siklus sel tersebut berbeda pada sel yang mengalami pemicuan dan sel yang mengalami penghambatan atau dengan perkataan lain ada perubahan

ekspresi protein selama transisi proliferasi ke differensiasi. Pada sel progenitor, kadar E2F, *G1-specific cyclin* dan cdk4 tinggi. Sedangkan pada sel post mitotik, kadar inhibitor cdk (p21cip1, p27kip1) dan supresor tumor tinggi (Tsai, 2004).

Pada awal embrio sampai pertengahan kehamilan ekspresi p53 adalah tinggi, kemudian menurun secara cepat. Jaringan yang telah selesai berdifferensiasi, tingkat ekspresi p53 rendah. Pada awal pertumbuhan, p53 diekspresikan dalam kadar tinggi. Stres genotoksik pada sel-sel yang telah berdifferensiasi biasanya (normalnya) memicu transkripsi *p53*. Pada SE, tidak memicu transkripsi p53 (secara partial tidak aktif) disebabkan kegagalan translokasi ke nukleus dan hal ini konsisten dengan temuan bahwa pada mencit (*mice*) *p53 knockout* dapat tumbuh normal tetapi meningkatkan kerentanan terhadap kanker pada kehidupan selanjutnya. Saat ini belum jelas apakah p53 mempunyai peran fungsional pada SE dan *signal* apa yang mengendalikan aktivitasnya pada sel muda *(early cell type*) (Tsai, 2004).

Cell line pluripoten yaitu SE, *germ* (EG) dan karsinoma (EC) adalah sel *undifferentiated* yang dapat membentuk semua jenis sel dalam tubuh. Luasnya potensi pertumbuhan dan rentang kehidupan yang tak terbatas dalam kultur membuat sangat menarik dan penting untuk diteliti, baik penelitian dasar maupun terapan. Mereka dapat berdifferensiasi *in vivo* maupun *in vitro*, memungkinkan untuk penelitian biologi pertumbuhan. Lebih jauh, secara genetik dapat dimanipulasi dan berpotensi dapat dipakai sebagai sumber sel yang dapat diperbarui (renewable) untuk memulihkan fungsi jaringan dengan cara rekayasa sel dan transplantasi. Adalah mungkin untuk mengenalinya dengan marker spesifik, antara lain andanya antigen tertentu, enzim dan ekspresi sejumlah gene. Tetapi dari marker tersebut tidak ada yang khusus sebagai marker jenis sel ini (Eiges dan Benvenisty, 2002).

Perbandingan perbedaan potensi pertumbuhan SE, EG dan EC *murine* menunjukkan bahwa meskipun semuanya punya sifat sama, perbedaan asalnya sering membatasi potensi pertumbuhannya. Misalnya SE, mempunyai potensi yang agak terbatas. Pada hewan *chimeric* mereka tidak dapat ditransmit ke *germ line*. Sel EG mudah mengalami differensiasi secara spontan, tetapi tidak dapat mendukung pertumbuhan normal karena terjadi modifikasi epigenetik selama pembentukan PGC ((*primordial germ cell*). SE menunjukkan potensi pertumbuhan paling besar, dapat berdifferensiasi ke berbagai macam sel (Eiges dan Benvenisty, 2002).



Gambar 01 : Potensi pertumbuhan SE *in vitro*. Differensiasi secara spontan dan induksi dari SE menghasilkan sel-sel ektoderm, mesoderm dan endoderm (Eiges dan Benvenisty, 2002)
PGC: *primordial germ cell*; EG: *Embrionik germ cell*; ICM: *Inner cell mass*.

Pada penelitian SE mencit, ada dua *pathway* molekul fungsional (yang tidak saling berhubungan) yang mempertahankan pluripotensi dan men-*support*

pertumbuhan undifferensiasi yaitu *pathway* LIF (*leukemia inhibitory factor*) dan Oct4. LIF men-*support* proliferasi undifferensiasi dari SE dan EG dengan cara berikatan dengan *gp130-LIF receptor heterodimer* dan mengaktivasi *STAT3 transcription factor* (Eiges dan Benvenisty, 2002).

Oct4 pada mencit berhubungan dengan fenotip sel totipoten / pluripoten. Oct4 diekspresikan oleh semua sel pluripoten selama embriogenesis dan juga banyak diekspresikan oleh *cell line* dari SE, EG dan EC. Oct4 diperlukan untuk mencegah differensiasi somatik dari ICM dan sangat penting (krusial) untuk mempertahankan status undifferensiasi selama pertumbuhan embrio. Lebih jauh Manipulasi ekspresi Oct4 *in vitro* menunjukkan bahwa Oct4 merupakan determinan dari nasib sel (*cell fate*). *pathway LIF* dan Oct4 keduanya terlibat dalam pengendalian pluripotensi, namun mekanisme molekuler dan gene yang mengatur masih belum banyak diketahui (Eiges dan Benvenisty, 2002). Pendapat Tsai (2004), keadaan pluripoten (*stem cell*) adalah kombinasi tertentu ekspresi gene, bukan ekspresi spesifik gene. Dengan lain perkataan, ada kombinasi spesifik *stem cell*, bukan gene spesifik *stem cell* (Tsai, 2004).

Mengetahui bagaimana *stem cell* berinteraksi dengan lingkungan mikro-nya yang disebut *niche* adalah sangat penting. Percobaan SE mencit pada kultur jaringan, SE dapat propagasi tak terbatas tanpa kehilangan potensi pluripotennya. Tetapi bila dihadapkan pada lingkungan asing, pada jaringan *in vivo* SE membentuk massa yang disebut teratoma, yang berisi sel-sel dari berbagai jenis. Sebaliknya, bila diinsersikan ke tengah blastosis mencit analog dengan lingkungan aslinya (alamiahnya), sifat SE pulih kembali dan dapat mengkontribusi untuk membentuk semua jenis jaringan sehat. Disimpulkan, yang menentukan sifat dan potensi pertumbuhannya adalah kombinasi dari karakteristik intrinsik *stem cell* dan lingkungan mikro-nya. (Fuchs *et al.*, 2004).

1407227

2.1.3 Produksi *cell graft*

2.1.3.1. Produksi *cell graft* dari *stem cell* dewasa

Proses differensiasi *stem cell* mesenchym menjadi tulang, tulang rawan dan lemak telah di deskripsikan oleh berbagai laboratorium. Aktivasi pembentukan tulang memerlukan adanya *β-glycerol-phosphate, ascorbic acid-2-phosphate*, dexametason dan *fet al., bovine serum*. Jika dikultur satu lapis sel (*monolayer*), dengan adanya suplemen bahan tersebut, morfologi sel menjadi osteoblastik, upregulasi aktivitas alkali fosfatase dan deposisi matrik ekstraseluler kaya kalsium. Differensiasi tulang rawan terjadi pada kondisi (1) Format kultur tiga dimensi (2) Medium nutrien tanpa serum dan (3 penambahan sejumlah superfamili TGF-β. Bila kondisi sesuai dengan kondisi tersebut, *stem cell* mesenchym secara cepat kehilangan morfologi fibroblas dan mulai menginisiasi ekspresi sejumlah komponen matrik ekstraseluler spesifik tulang rawan (Barry dan Murphy 2004). Hal tersebut berhubungan dengan cepatnya timbul proses biosintesa glycosaminoglycan dan diikuti perubahan menyolok morfologi sel (Barry dan Murphy, 2004).

Sel beta tidak dapat propagasi pada kultur dan sel-sel tumor sel beta akan kehilangan secara cepat fenotip sel beta bila dikultur *in vitro*. Tetapi *cell line* permanen yang mensekresi insulin dapat dibuat dengan kondisi imortalisasi sel beta (Colman, 2004; Zalzman *et al.,* 2003) telah membuat mencit transgenik yang mengekspresikan *SV40 large T antigen* yang secara khusus dengan adanya derivat tetrasiklin dapat diinduksi menjadi sel beta (Zalzman *et al.,* 2003 *cit.* Colman, 2004). Mencit di beri makanan tumor yang ditumbuhkan dengan doksisiklin (*doxycycline developed tumor*) yang pada isolasi perlu adanya doksisiklin agar tetap proliferasi. Berhentinya (*arrest*) pertumbuhan dipicu dengan cara menghilangkan obat. Stimulasi sel dengan glukosa menyebabkan

peningkatan pelepasan insulin tiga kali lipat. Insersi sel ke intraperitoneal dari mencit singeneik yang diterapi STZ (*STZ-treated syngeneic mice*) menyebabkan normoglikemia sepanjang penelitian (45 hari). Doksisiklin hanya diberikan pada hari pertama setelah transplantasi dan tidak ditemukan tumor pada pada mencit yang diterapi. Apakah teknologi ini dapat diaplikasikan pada manusia, tampaknya masih belum jelas (Colman, 2004).

Sehubungan pengalaman sulitnya mengkultur berbagai sel yang telah berdifferensiasi sempurna (*terminally differentiated cell*), maka pada area diabetes, fokus perhatiannya adalah tertuju pada deteksi dan kultur progenitor sel beta atau *stem cell*. Yang menjadi masalah adalah belum adanya identitas atau bahkan eksistensi sel tersebut. Ada beberapa klaim tentang adanya progenitor sel beta pada islet, duktus-duktus dan bahkan pada jaringan yang jauh seperti sumsum tulang (Colman, 2004).

Data baru baru ini, didasarkan pada sel *lineage* yang diberi tanda (lineage-marked cell) menunjukkan bahwa progenitor sel beta adalah sel beta itu sendiri (Colman, 2004). Klaim progenitor duktus antara lain didasarkan pada hasil observasi tentang pertumbuhan pankreas embrio, neogenesis pankreas dan patologi klinik yang menunjukkan bahwa jaringan endokrin baru (atau *remodelling*?) berkaitan erat dengan duktus. Sebagai tambahan, banyak data yang menunjukkan sel ins+ dan pdx1+ dapat tumbuh pada kultur *in vitro* dari material duktus meskipun identitas sel progenitornya belum diketahui. Hal ini menimbulkan interes kemungkinan kultur *in vitro* dapat merubah secara radikal tidak hanya nasib sel (*cell fate*) tetapi juga potensinya. Mekanisme dari hal tersebut masih belum di eksplorasi. Bisa jadi, potensi *stem cell* dan progenitor tidak bisa terwujud *in vivo* karena efek represif dari lingkungan lokal, dan menjadi bebas hanya jika lingkungannya dirubah. Alternatif lain, pada kultur lama timbul sifat sifat baru dari sel (Colman, 2004).

Ramiya *et al.,* (Ramiya 2000 *cit.* Colman, 2004) melaporkan kultur panjang dari duktus pankreas mencit menghasilkan *stem cell* yang memproduksi islet (*islet-producing stem cells*). Sel-sel ini dapat mencegah kematian mencit karena hiperglikemi dan juga secara bermakna menurunkan hiperglikeminya (Colman, 2004). Pemakaian sel-sel duktus tersebut didasarkan pada kepercayaan bahwa sel-sel epitel duktus insitu mengandung sel progenitor endokrin (Colman, 2004).

2.1.3.2. Produksi cell graft dari SE

SE adalah sel pluripoten yang dapat berdifferensiasi *in vivo* menjadi berbagai sel somatik dan sel germinativum. Meskipun kemampuan differensiasi SE *in vitro* agak terbatas, telah dilaporkan differensiasi SE *in vitro* menjadi beberapa macam sel seperti sel-sel darah, kardiomiosit, sel endothel, sel neuron, sel glial, sel-sel yang mensekresi insulin dan oosit (Nakano, 2003).

Lebih dari 2-3 tahun lalu, sejumlah penelitian telah melaporkan mengarahkan SE mencit menjadi sel saraf kemudian dimanipulasi untuk membentuk IC (*Islet-like cell*) (Colman, 2004). Pioner pendekatan ini adalah Lumelsky *et al.,* (2001). Langkah pertama memproduksi EB (*embryoid body*). Selanjutnya EB ditanam dalam medium tanpa serum untuk memilih *stem cell* saraf yang mengekspresikan nestin, yang hidup dan berproliferasi (Lumelsky et al., *cit.* Colman, 2004). Kondisi pertumbuhan kemudian diarahkan pada pembentukan sel-sel endokrin pankreas. Kelompok sel terbentuk dan menunjukkan adanya produksi insulin, glukagon dan somatostatin. (Colman, 2004).

Transplantasi sel-sel ini pada kapsul ginjal atau ke limpa mencit dapat sedikit mengurangi hiperglikemia. Diperkirakan, penurunan hiperglikemia sebagai konsekuensi dari kombinasi restriksi volume pada kapsul ginjal dan kadar insulin suboptimal dari IC (Colman, 2004). Nefrektomi dari ginjal yang sudah dilakukan

modifikasi mengakibatkan kenaikan segera yang bermakna dari hiperglikemia (Colman, 2004).

Namun, meski telah dicoba dilakukan beberapa kali, usaha tersebut tidak berhasil diulangi (*reproduced*). Hal tersebut disebabkan inhibitor PI3K yang sangat toksik terhadap sel mencit dan lebih toksik lagi terhadap sel manusia. Strategi alternatif untuk membuat IC dari SE adalah dengan eksplorasi kecenderungan alamiah dari SE untuk berdifferensiasi secara spontan menjadi berbagai jenis sel. Beberapa kelompok peneliti telah melaporkan adanya IC dalam EB atau kultur konfluen baik SE mencit maupun SE manusia (Colman, 2004).

Satu cara yang konventional dan sering digunakan dalam induksi differensiasi adalah pembentukan EB. Jika SE dikultur dalam suspensi tanpa LIF, sel-sel akan agregasi, terjadi pertumbuhan lebih lanjut dan muncul EB. Dalam EB tumbuh berbagai *lineage* sel dan dengan penambahan BMP-4 (bone morphogenetic protein-4) dan sitokin hematopoietik terjadi differensiasi menjadi sel hematopoietik (Nakano, 2003).

Metode induksi lainnya adalah kokultur SE dengan *cell line* dari stroma. Sel-sel stroma OP9 yang tidak mempunyai MCSF (*macrophage-colony stimulating factor*) dapat menginduksi differensiasi dengan efisien. Metode induksi ini disebut sistem OP9. Sistim ini secara efektif menghasilkan sel-sel pre-B yang mempunyai karakteristik ekivalen dengan sel-sel sumsum tulang. Kokultur tidak dapat menghasilkan limfosit T. Sistim OP9 dapat menghasilkan limfosit T dari progenitor pre-hematopoietik setelah tahap maturasi pada kultur organ thymus (Nakano, 2003). Pada kera, sistim OP9 dapat menginduksi sel-sel mesodermal dan hematopoietik dan setelah ditransplantasikan pada domba dapat mengkontribusi hematopoiesis secara bermakna. Pada manusia,

MILIK
PERPUSTAKAAN
Universitas Brawijaya

differensiasi hematopoietik dari SE nampaknya juga lebih efisien dengan sistim OP9 (Nakano, 2003).

2.1.4. Aplikasi Terapi sel

Terapi *stem cell* adalah transplantasi *stem cell* ke pasien, baik secara lokal (*local delivery*) atau infus sistemik (*systemic infusion*). Pada awalnya pendekatan klinis dilakukan dengan memberikan sel secara lokal yaitu langsung ke area yang sebelumnya kena jejas, misalnya miosit otot bergaris diinsersikan langsung pada jaringan parut bekas infark miokard atau sel-sel neuron ke otak penderita Parkinson (Humes dan Szczypka, 2004; Barry dan Murphy, 2004).

Secara teoritis, hESC merupakan sumber dari prekursor sel yang dapat berdifferensiasi ke semua jenis sel untuk terapi penyakit degeneratif, keganasan kelainan genetik atau jejas yang disebabkan inflamasi, infeksi dan trauma (Lerou dan Daley 2005). Transplantasi *stem cell* hematopoietik telah dipakai bertahun tahun untuk terapi leukemia dan kanker kanker lainnya. Beberapa contoh pemakaian terapi *stem cell* mesenchym dari sumsum tulang telah dilaporkan. Laporan meliputi indikasi pemakaian yang luas (*broad spectrum*) antara lain untuk reparasi kardiovaskuler, terapi fibrosis paru, jejas *spinal cord* serta tulang dan tulang rawan (Barry dan Murphy, 2004).

Sejumlah penelitian melaporkan bahwa *stem cell* dewasa mempunyai plastisitas dapat berdifferensiasi menjadi otot jantung (Barry dan Murphy, 2004; Fraser *et al.,* 2004). Hal ini mengindikasikan bahwa terapi *stem cell* dapat digunakan untuk terapi penyakit pembuluh darah koroner. Stamm *et al.,* (2003) mendemonstrasikan penggunaan praktis pendekatan ini dalam penelitian pemberian sel-sel sumsum tulang ke daerah infark pada pasien setelah menderita infark miokard. Saito *et al.,* (2002) menunjukkan bahwa *stem cell* mesenchym dapat ditoleransi dalam lingkungan xenogeneik dan tetap

mempunyai kemampuan direkrut dalam miokardium yang mengalami jejas kemudian mengalami differensiasi menjadi fenotip jantung (Saito et al., *cit.*. Barry dan Murphy, 2004).

Hasil dari terapi ini adalah perbaikan yang dramatis dari fungsi global jantung (Stamm *et al., cit.* Barry dan Murphy, 2004). Deb *et al.,* (2003) juga menunjukkan bahwa kardiomiosit derivat sumsum tulang dapat tertanam (*engraftment*) pada jantung orang dewasa setelah transplantasi sumsum tulang (Deb *et al.,* cit Barry dan Murphy. 2004). *Stem cell* dewasa dapat dipakai terapi pada jantung seperti pada tabel 1.

Stem cell dapat berdifferensiasi *in vivo* menjadi fenotip otot bergaris. Gussoni *et al.,* (1999) menunjukkan bahwa *stem cell* dari *murine* yang diinsersikan ke otot quadrisep mencit mengekspresikan distrofin yang berhubungan dengan serabut otot sarkolemma, dan diarahkan untuk potensi terapi distropi otot (Gussoni *et al., cit.* Barry dan Murphy, 2004).

Stem cell mesenchym dapat tertanam dalam jumlah besar (*engraft at high level*) pada jaringan paru setelah dipapar dengan bleomisin dan dapat mencegah kerusakan pada jejas paru yang dipicu bleomisin seperti inflamasi dan deposisi kolagen. Hal ini mempunyai implikasi luas pada area penyakit paru akibat kerusakan lingkungan (Barry dan Murphy, 2004).

Stem cell yang diisolasi dari sumsum tulang belakang (*spinal cord*) tikus (*rat*) mampu berdifferensiasi menjadi neuron, astrosit dan oligodendrosit (Shihabuddin *et al.,* 2000 *cit.*. Barry dan Murphy, 2004) dan implantasi *stem cell* neuron pada model tikus (*rat*) dewasa yang mengalami jejas sumsum tulang belakang memberikan perbaikan fungsional dalam jangka yang panjang (Teng *et al.,* 2002 *cit.*. Barry dan Murphy). Pada model hewan coba penyakit Parkinson, SE dapat membentuk neuron dopamin (Kim *et al.,* 2000 *cit.* Barry dan Murphy, 2004). *Stem cell* derivat sumsum tulang dapat berdifferensiasi menjadi sel saraf

in vitro dan setelah ditransplantasikan pada mencit dan tikus (*mice and rat*) sampai pada kesimpulan bahwa *stem cell* sangat berguna untuk terapi *stroke*, jejas trauma dan penyakit Parkinson (Sanchez-Ramos, 2002 *cit.* Barry dan Murphy, 2004).

Tabel 1 : Ringkasan studi klinis terapi sel untuk jantung (Fraser *et al.*, 2004).

Cell source	*Disease*	*No. of patients*	*Outcome highlights*
Marrow mononuclear cells	*Stable angina*	*9*	*Decreased angina and angina meds, modest improvement in ventricular wall motion and wall thickness*
Marrow mononuclear cells (overnight culture)	*5–9 days post-infarct*	*10*	*Decreased infarct region from 30 ?13 to 12 ?7%, improved wall motion from 2.0 ?1.1 to 4.0 ?2.6 cm/s, P = 0.028*
Marrow mononuclear cells	*< 3 days post-infarct*	*10*	*Improved ejection fraction (from pre-treatment 51.9% to post-treatment 60.7%), improved end diastolic volume, and cardiac perfusion*
Marrow mononuclear cells	*Congestive heart failure*	*14*	*Improved ejection fraction (from pre-treatment 20% to post-treatment 29%), improved scores in heart function test*
Cultured blood-derived EPCs	*< 3 days post-infarct*	*10*	*Improved ejection fraction (from pre-treatment 51.3% to post-treatment 59.5%), end diastolic volume, and cardiac perfusion*
CD133-selected marrow cells	*< 3 months post-infarct*	*6*	*Difficult to interpret due to concomitant coronary artery by-pass surgery; 4/6 patents showed unspecified increase in ejection fraction*
800 x 10^6 skelet al., muscle myoblasts	*Congestive heart failure*	*10*	*Improved ejection fraction (from pre-treatment 24% to post-treatment 32%), 14 of 22 ventricular wall segments thicker*

Lebih lanjut, baru baru ini ditemukan bahwa sel-sel sumsum tulang dewasa setelah ditransplantasikan dapat masuk ke otak dan menjadi neuron (Mezey *et al.*, 2003 *cit.* Barry dan Murphy, 2004). Hal ini ditambah dengan pengamatan pengamatan sejenis lain yang dramatis, menimbulkan semangat dan optimisme tentang pemakaian terapi *stem cell* pada jejas neuron (Barry dan Murphy, 2004).

Pemakaian *stem cell* pada terapi sistim saraf, telah dilaporkan digunakan untuk terapi keganasan. Pada hewan coba dan uji klinik fase I (phase I clinical trials), *stem cell* berhasil untuk terapi keganasan melalui peningkatan respon imun terhadap TAA (tumour-associated antigen). Sebagai sumber baru dari *stem cell* adalah SE (Fairchild *et al.*, 2005).

Pada area kedokteran ortopedi, juga banyak contoh aplikasi terapi lokal *stem cell* sumsum tulang, antara lain fusi spina (*spine fusion*), repair defek segmental tulang, defek kraniotomi. Pendekatan yang sama juga dipakai untuk repair defek lokal dari sendi tulang rawan dan tendon (Barry dan Murphy, 2004).

Pada model hewan osteoartritis yang mengenai jejas pada meniskus, pemberian *stem cell* dengan injeksi intraartikuler menghasilkan sel-sel tersebut tertanam dalam meniskus, bantalan lemak dan sinovium disertai regenerasi meniskus dan proteksi tulang rawan. Ringkasan aplikasi terapi *stem cell* mesenchym pada model hewan seperti pada tabel 2 (Barry dan Murphy, 2004).

Ada beberapa laporan yang menjelaskan pemakaian klinis sel-sel donor allogeneik yang tidak *match* (*allogeneic donor-mismatched cell*) dan menimbulkan sedikit rejeksi imun dari *host* atau GVHD (*graft-versus-host disease*). Sebagai contoh transplantasi sumsum tulang allogeneik pada anak dengan Osteogenesis Imperfecta menghasilkan tertanamnya *stem cell* mesenchym donor dan peningkatan pembentukan tulang baru.

Infus *stem cell* mesenchym allogeneik ke pasien yang menderita *Hurler's syndrome* atau *metachromatic leukodystrophy* tidak nampak adanya alloreaktif dari sel T dan tidak ada GVHD. Tertanamnya *stem cell* mesenchym juga ditunjukkan pada pasien anemia aplastik idiopatik dan ada perbaikan dari fungsi stroma sumsum tulang. Ringkasan status aplikasi terapi *stem cell* mesenchym pada klinik seperti pada tabel 3 (Barry dan Murphy, 2004).

Tabel 2 : Aplikasi terapi sel menggunakan *stem cell* mesenchym pada model hewan (Barry dan Murphy, 2004).

Indication	*Animal model/route of delivery*	Sumber *Stem cell*	*Result*
Myocardial infarction	*Mouse/direct injection*	*Lin−c-kit+ bone marrow cells*	*De novo myocardium*
Myocardial infarction	*Immunocompetent Lewis rats/IV injection 1 week pre-infarction*	*C57B1/6 mouse MSCs*	*Donor-derived cardiomyocytes and angiogenesis*
Muscular dystrophy	*mdx mouse/IV injection*	*Normal mouse muscle-derived MSCs*	*Partial restoration of dystrophin expression in affected muscle*
Lung fibrosis	*Bleomycin (BLM)-sensitive C57BL/6 mouse/IV injection*	*BLM-resistant BALB/c mouse*	*Reduced inflammation and collagen Deposition*
Spine fusion	*Canine bone marrow-derived cells/cancellous bone matrix*	*Autologous*	*Improved bone grafting*
Segmental bone defects	*Athymic rat/ceramic carrier*	*Human MSCs*	*Enhanced bone formation and improved biomechanics*
	Canine/ceramic carrier	*Autologous MSCs*	*Enhanced bone formation Bruder*
	Canine/ceramic carrier	*Allogeneic MSCs*	*Enhanced bone formation*
Craniotomy defect	*Immunocompromised mouse/gelatin sponge*	*Alloplastic transgenic mouse marrow stromal cells*	*>99% repair within 2 weeks*
Tendon defect	*Rabbit/contracted collagen gel*	*Autologous MSCs*	*Improved tendon biomechanics, structure and function*
Meniscus	*Caprine/intraarticular injection*	*Autologous MSCs*	*Enhanced tissue formation and reduced osteoarthritis*

2.1.5. Interaksi *host* dengan sel yang diimplantasikan.

Pertanyaan respon *host* terhadap *stem cell* mesenchym yang di implantasikan adalah penting (kritis) dan menerima banyak perhatian karena sel

ini dipertimbangkan dalam berbagai aplikasi klinis. Ada beberapa aspek interaksi antara sel yang diimplantasikan dengan *host* yang perlu diperhatikan dalam usaha untuk mengerti mekanisme yang mendasari terapi sel, yaitu (1) respon imun *host* pada sel yang ditransplantasikan. (2) mekanisme *homing* yang mengarahkan sel yang diimplantasikan ke tempat jejas. (3) differensiasi sel yang diimplantasikan dalam pengaruh *signal* lokal (Barry dan Murphy, 2004).

Tabel 3 : : Aplikasi terapi sel menggunakan *stem cell* mesenchym (Barry dan Murphy 2004).

Indication	*Source/route of delivery*	*Result*
Myocardial infarction	*AC133+ bone marrow cells/direct injection*	*Function enhanced in 4/6 and tissue perfusion improved strikingly in 5/6 patients*
Osteogenesis imperfecta	*Allogeneic bone marrow transplantation/infusion*	*New dense bone formation and engraftment of donor-derived cells in three patients*
Large bone defect	*Autologous bone marrow stromal cells/scaffold*	*Enhanced bone repair in 1/1 patient*
Metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome	*Allogeneic MSCs/infusion*	*Significant improvements in nerve conduction velocities in 4/6 MLD patients; no GVDH*
Severe idiopathic aplastic anemia	*Allogeneic MSCs/infusion*	*Improved stroma in 1/1 patient*

2.1.5.1 Respon imun dari *host*.

Stem cell mesenchym dapat menekan reaksi limfosit yang melibatkan sel dendritik .atau sel T otologus maupun allogeneik. Di Nicola *et al.,* (2002) menemukan bahwa proliferasi sel T manusia, yang dirangsang oleh limfosit darah perifer allogeneik yang diradiasi, sel-sel dendritik atau fitohemaglutinin banyak di supresi bila kultur juga mengandung *stem cell* mesenchym. Mereka juga menemukan bahwa efek ini berbalik dengan penambahan antibodi monoklonal yang menetralisir efek TGF-β1 dan HGF (*hepatocyte growth factor*) (Barry dan Murphy, 2004). Efek ini merupakan represi spesifik reaksi limfosit dan

bukan karena apoptosis. *Stem cell* mesenchym secara aktif mensupresi proliferasi sel T. (Barry dan Murphy, 2004).

Ada kenyataan yang tidak diragukan lagi bahwa *stem cell* mesenchym manusia , yang mempunyai imunofenotip tersendiri, tidak mengekspresikan HLA klas II, ekspresi ko-stimulator yang rendah dan mungkin nonimunogenik atau hipoimunogenik. Pemakaian *stem cell* mesenchym allogeneik mempunyai banyak keuntungan, paling tidak pada keadaan akut, misalnya setelah infark miokard. Sedangkan kerugian dari allogeneik adalah berhubungan dengan potensi risiko penularan penyakit dari donor ke resipien (Barry dan Murphy, 2004).

2.1.5.2. Mekanisme *Homing*.

Transplantasi *stem cell* mesenchym manusia ke fetus domba menyebabkan tertanamnya sel dalam jangka panjang ke berbagai jaringan, bahkan setelah imunokompetennya tumbuh. Bila *stem cell* mesenchym diberikan melalui infus intravena, dapat migrasi secara spesifik ke lokasi jejas. Kemampuan luar biasa dari sel yang diimplantasi untuk mencari lokasi jejas tersebut telah dibuktikan pada kasus fraktur tulang, infark miokard dan jejas iskemi serebral. Selain itu *stem cell* mesenchym dalam suspensi yang diinjeksikan ke intraartikuler sendi lutut setelah terjadi jejas trauma dapat tertanam secara spesifik dan memperbaiki tulang rawan dan meniskus yang rusak (Barry dan Murphy, 2004).

Mekanisme yang membimbing *homing* dari sel yang diimplantasikan adalah masih belum jelas, tetapi satu penelitian menunjukkan bahwa pada jaringan otak iskemi, kemokin MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) memicu migrasi dari *stem cell* mesenchym yang diberikan lewat infus menuju lokasi jejas. Mereka menunjukkan, pada tikus (*rat*) bahwa MCP-1, yang di otak normal tidak ada, secara cepat meningkat (upregulasi) setelah oklusi arteri serebral media. MCP-1

adalah kemotaktik pada *stem cell* mesenchym. *Homing* dan ekspansi dari *stem cell* mesenchym ke *host* yang jejas juga ditunjukkan oleh Rombouts dan Ploemacher (2003). Mereka menunjukkan bahwa pada *host* yang diradiasi ada migrasi dan ekspansi *stem cell* mesenchym singeneik yang mengekspresikan GFP (*green fluorescent protein*) ke sumsum tulang dan limpa. Bila hewan tidak diradiasi, migrasi dan ekspansi tidak terjadi. Hal ini konsisten dengan konsep bahwa sel-sel tersebut secara khusus tertarik ke suatu lingkungan luka (*wound environment*). Menariknya penulis ini juga mencatat efisiensi *homing* dari sel-sel tersebut menurun setelah dikultur lama, yang merupakan efek berpengaruh terhadap preparasi sel untuk pemakaian terapi (Barry dan Murphy, 2004).

Prinsip dasar terapi *stem cell* adalah bahwa sel-sel undifferensiasi, setelah diberikan pada *host* yang mengalami jejas dan migrasi ke lokasi jejas, dibawah pengaruh *signal* lokal akan berdifferensiasi ke fenotip sel yang sesuai. Differensiasi sel ini kemudian mengkontribusi penyembuhan pada jaringan yang mengalami jejas. Fakta menunjukkan bahwa hal ini merupakan kenyataan (kasus), tetapi sedikit atau tidak ada data yang menunjukkan adanya *signal* khusus yang merangsang differensiasi insitu. Sebagai contoh, sel-sel yang di implantasikan pada defek tulang, misal adanya celah yang lebar pada femur, akan merangsang pembentukan tulang baru yang dapat dilihat secara radiologis maupun histologis. Hal yang sama menunjukkan bahwa *scaffold* yang diisi oleh *stem cell* dan di implantasikan ke lesi osteokondral pada kondilus medial femur, menumbuhkan tulang dan tulang rawan. Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa pemberian *stem cell* dari *murine* ke mencit distrofi menimbulkan implantasi dari sel-sel yang mengkontribusi distrofin ke sarcolemma serabut otot (Barry dan Murphy 2004).

2.1.5.3. Peran *stem cell* pada penyakit

Ada perspektif lain tentang peran *stem cell* dewasa pada penyakit. Ada konsep bahwa pada beberapa penyakit, disebabkan oleh habisnya populasi atau perubahan fungsi *stem cell* (Barry dan Murphy 2004; Lerou dan Daley 2005). Habisnya populasi atau perubahan fungsi *stem cell* ini terjadi pada kasus osteoartritis, penyakit dari sendi yang terjadi hilangnya tulang rawan secara progresif dan irreversibel, yang juga mengenai tulang di bawahnya (Barry dan Murphy, 2004).

Berdasarkan data yang ada, diperkirakan kerentanan terhadap osteoartritis dan penyakit degeneratif lain disebabkan berkurangnya mobilisasi atau proliferasi dari *stem cell*. Selain itu, kemungkinan sel-sel yang berhasil direkrut, mempunyai kapasitas differensiasi yang terbatas sehingga menghambat penyembuhan jaringan. Alternatif lain, adanya perubahan aktivitas *stem cell* sebagai respon terhadap meningkatnya sitokin inflamasi yang ada dalam osteoartritis (Barry dan Murphy 2004)..

2.2. Hubungan Kedokteran Regeneratif dan Transfer Nukleus.

Kedokteran regeneratif bersama dengan rekayasa jaringan (*tissue enginering*) mempunyai tujuan memulihkan bentuk dan fungsi dari jaringan atau organ yang rusak karena penyakit dan jejas. Banyak kelainan seperti kelainan kongenital, kanker, trauma, infeksi, inflamasi, jejas iatrogenik dan kondisi lain mengakibatkan rusak atau hilangnya organ dan memerlukan rekonstruksi (Koh dan Atala, 2004).

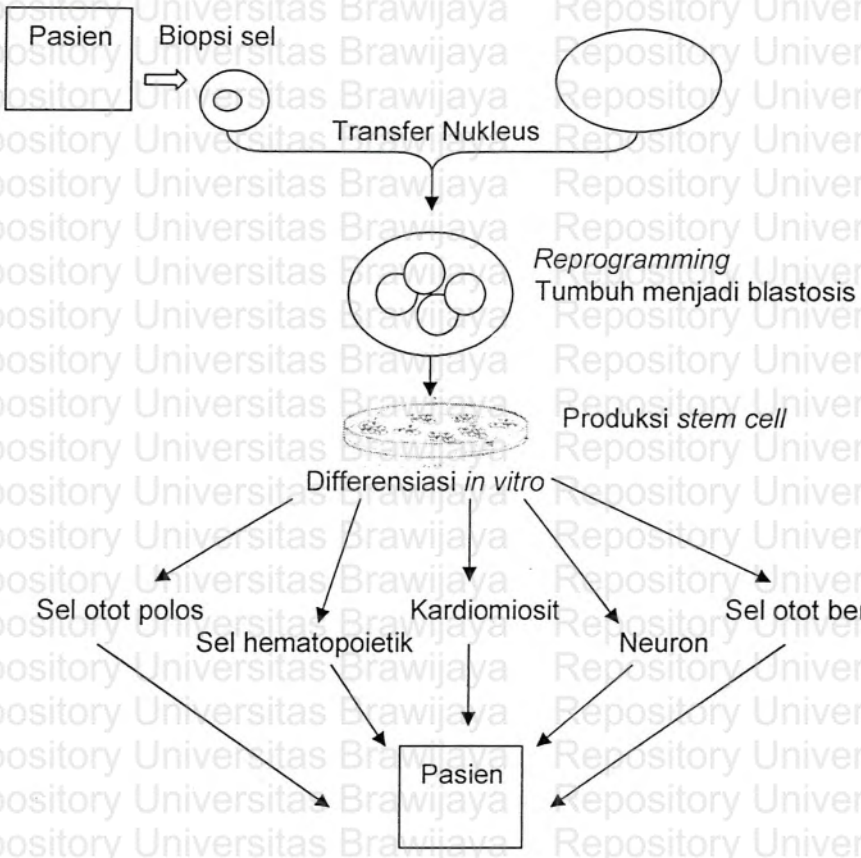
Mayoritas teknik rekonstruksi saat ini mengandalkan pada jaringan donor namun keterbatasan ketersediaan jaringan donor menghambat rekonstruksi memakai metode ini dan biasanya menimbulkan morbiditas yang bermakna selama prosedur pengambilan donor. Lebih lanjut, aspek fungsional dari jaringan yang rusak adalah jarang tergantikan dengan prosedur ini. Peneliti dan dokter

kedokteran regeneratif (*regenerative medicine physician*) mengharapkan penyembuhan pasien secara komprehensif dan jika memungkinkan mereparasi dan memulihkan jaringan yang rusak dengan harapan regenerasi jaringan tubuh menjadi normal kembali (Koh dan Atala, 2004).

Transplantasi organ merupakan salah satu metode yang pertama kali dilakukan untuk memulihkan bentuk dan fungsi dalam kedokteran modern. Keberhasilan transplantasi organ (ginjal) pertama kali dilakukan oleh Murry pada tahun 1955. Selanjutnya dengan kemajuan dibidang pengobatan imunosupresi, pemilihan (*matching*) donor yang sesuai dengan resipien dan terapi rejeksi telah banyak pasien yang berhasil ditangani dengan dilakukan transplantasi (Koh dan Atala, 2004).

Teknologi TN mempunyai potensi yang menguntungkan kedokteran regeneratif untuk memulihkan fungsi jaringan dengan transplantasi sel.. Dengan kelahiran dolly sebagai hewan kloning dari sel somatik pada tahun 1997, memberikan peluang untuk membuat SE dengan teknologi TN. Pada metode ini sebuah nukleus dari sel somatik pasien di fusi dengan sebuah sel telur yang kromosomnya telah dihilangkan dan ditumbuhkan *in vitro* sampai stadium blastosis. SE diproduksi dari blastosis hasil TN. SE dari hasil TN ini dapat diarahkan / diinduksi menjadi tipe sel tertentu yang dibutuhkan untuk terapi sel (terapi sel *graft* dari otologus), yang sesuai (*match*) terhadap pasien sehingga dapat mencegah rejeksi dan tidak lagi memerlukan imunosupresi. Namun hal tersebut saat ini masih dalam status tahap penelitian (Strom *et al.,* 2001; Eiges dan Benvenisty, 2002; Henningson et al., 2003; Koh dan Atala, 2004).

Secara skematis produksi jaringan otologus untuk transplantasi sel dengan menggunakan teknologi TN adalah seperti pada gambar 02 dan 03..

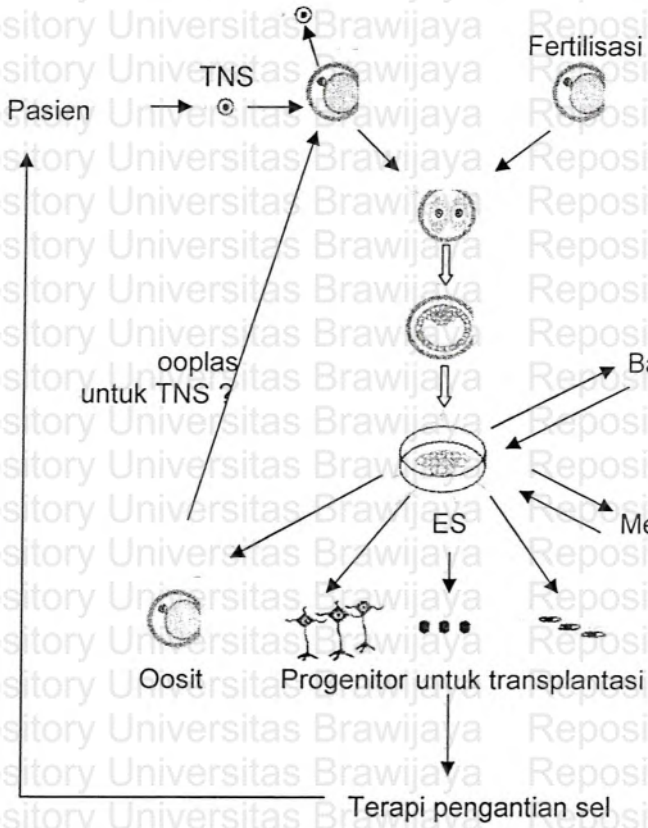


Gambar 02 : Strategi TN untuk menghasilkan jaringan otologus dengan fusi sel somatik ke oosit enukleasi dan *reprogramming*, diikuti pertumbuhan blastosis, pembuatan *stem cell* dan differensiasi *in vitro* (Wobus, 2001).

Sel rekonstruksi hasil TN dapat diarahkan berkembang menjadi jaringan dan organ spesifik untuk mengganti kerusakan akibat penyakit dan mungkin dapat memperbaiki berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh hilang atau tidak berfungsinya sel (Perpich, 2004; Reubinoff, 2004). Potensi untuk memperbanyak diri (*self renewal*) dan kemampuan berdifferensiasi ke berbagai jenis sel membuat sel ini menjadi sumber sel yang tak terbatas untuk terapi transplantasi (Reubinoff, 2004).

Pada banyak pasien dengan kegagalan organ stadium akhir, biopsi jaringan biasanya tidak dapat memperoleh sel-sel normal yang jumlahnya

memadai untuk dapat dikembangkan, yang selanjutnya dipakai sebagai bahan untuk transplantasi. Pada kondisi seperti ini sumber untuk kepentingan transplantasi adalah SE dan dari sel tersebut dapat diproduksi jaringan sebagai bahan transplantasi (Koh dan Atala, 2004).



Gambar 03 : Berbagai potensi aplikasi terapi mengunakan hES yang didapat dari ICM blastosis kemudian dikembang-biakkan. hES merupakan sumber yang tak terbatas dari sel-sel untuk transplantasi. Untuk menghindari rejeksi tubuh, SE dapat didapat dari blastosis hasil TNS dari pasien ke oosit resipien. Oosit resipien dapat didapat dari SE (Bongso dan Richards, 2004).

Terakhir, SE yang dihasilkan dari TN mungkin juga dapat untuk terapi gen, dengan memodifikasi genetik sel yang ditransplantasikan agar membawa dan mengekspresikan gene spesifik dalam organ target (Reubinoff, 2004). Selanjutnya, masih ada banyak masalah keilmuan (*scientific*) dan medis yang harus diatasi dalam teknologi SE sebelum dapat diterapkan pada pasien. Selain

itu, produksi SE manusia memerlukan perusakan embrio manusia yang akan menimbulkan masalah sosial dan etik yang apabila tidak diperhatikan akan mengubur berkembangnya keilmuan. Hal ini bukan barang baru dalam ilmu biomedik. Ketika banyak pertanyaan tentang aspek keamanan dan aspek moral tentang teknologi DNA rekombinan pada tahun 1970 an, akhirnya dapat diyakinkan bahwa penelitian sesuai dengan standard keilmuan dan etika. Mekanisme yang sama akan memecahkan kontroversi dalam kedokteran regeneratif (Koh dan Atala, 2004; Perpich, 2004). Sebagai sumber sitoplasma resipien, dimungkinkan berasal dari *stem cell* yang ditumbuhkan menjadi oosit. Hubner *et al.,* (2003) telah menumbuhkan oosit dari SE mencit.

2.3. Transfer Nukleus

2.3.1. Sejarah Transfer Nukleus

TNS berarti transplantasi nukleus sel somatik ke oosit yang belum difertilisasi, yang telah diambil nukleusnya. Bergantung pada hasil yang diharapkan , oosit rekonstitusi atau rekonstruksi yang dihasilkan dapat ditumbuhkan sampai menjadi blastosis saja, atau dilanjutkan sampai kelahiran. Bila bertujuan memproduksi janin dan dilanjutkan sampai kelahiran keturunan hidup disebut kloning reproduksi. Sedangkan kloning terapeutik adalah mengisolasi SE dari blastosis sebelum menjadi janin, untuk dijadikan sel spesifik atau neo-organ dengan tujuan terapi penyakit (Mollard *et al.,* 2002). Reproduksi alamiah pada mamalia meliputi rekombinasi genom dari paternal dan maternal. Sedangkan embrio rekonstruksi hasil TN merupakan suatu *clone* karena merupakan replikasi material genetik donor tanpa ada rekombinasi genom. Reproduksi yang terjadi tanpa rekombinasi genetik disebut reproduksi partenogenesis (Mollard *et al.,* 2002).

TN memakai *Rana Pipiens* dilaporkan pertama kali tahun 1952 oleh Briggs dan King. Mereka menunjukkan bahwa nukleus tertentu dapat diarahkan tumbuh menjadi individu dewasa yang matang secara seksual (Hozumi, 2001; Tsunoda dan Kato, 2002). Tahapan teknik TN pada umumnya dikerjakan seperti tabel 4 berikut.

Tabel 4: Teknik Transfer Nukleus (Tsukada *et al.,* 2001; Mollard *et al.,* 2002).

No	Langkah
1.	Oosit dibawa ke lapangan pandang mikroskop
2.	Oosit dipegang dengan pipet pemegang (*Holding pipette*)
3.	Oosit diputar pada posisi sedemikian rupa sehingga nukleus dapat dicapai secara mudah oleh pipet injeksi
4.	Pipet injeksi diinsersikan pada ruang perivitellin
5.	Nukleus diaspirasi (enukleasi)
6.	Nukleus donor diinsersikan ke oosit enukleasi (oosit yang telah dienukleasi).
7.	Kultur embrio

Untuk manipulasi oosit (menggerakkan, memutar dsb), manipulator ada yang secara manual dan memakai tenaga tekanan air (*hydraulic pressure*), oli (*oil pressure*) atau tekanan udara (*air pressure*). Dengan mikromanipulasi manual, maka TN memerlukan ketrampilan tinggi dari operator. Apabila TN dapat dilakukan dengan teknik automatisasi maka akan dapat meningkatkan efisiensi (Hozumi, 2001; Tsukada *et al.,* 2001). Teknik automatisasi telah dikembangkan oleh Tsukada *et al.,* (2001), dengan teknik memutar oosit memakai tenaga listrik, sistim insersi nukleus dengan mekanisme *micro movement* (*Piezoelectric impact Drive Mechanism*), dan sistem *shaker* untuk menggerakkan cawan petri. Choi *et al.,* (2002) juga telah mengembangkan insersi nukleus sel somatik dengan teknik automatisasi (*piezo-driven injection of somatic cell nuclei*).. TNS telah dikembangkan untuk memproduksi hewan transgenik, *knock-in* dan *knock-out*.

Hewan yang telah dapat diproduksi menggunakan TNS meliputi berbagai spesiaes antara lain biri-biri, sapi, mencit, kambing, babi, kucing dan kelinci (Han *et al.*, 2003).

2.3.2. Masalah Aplikasi Transfer Nukleus dalam Kedokteran

Meskipun menjanjikan, TNS masih mempunyai keterbatasan yang memerlukan perbaikan sebelum dapat dipakai secara luas dalam terapi penggantian sel. Efisiensi TN masih rendah. Dengan lain perkataan, perlu dilakukan TN berkali kali untuk aplikasi TN. Potensi pertumbuhan embrio rekonstitusi pada domba, sapi (*bovine*), babi dan mencit antara 0,5 dan 18 %. Sedangkan keberhasilan yang lebih tinggi (80%) telah dilaporkan pada sapi (*cattle*) yang antara lain disebabkan oleh tersedianya teknologi sapi yang sudah berkembang seperti produksi embrio *in vitro*, TN yang telah dikembangkan untuk spesies ini untuk keperluan pertanian (Koh dan Atala, 2004).

Untuk memperbaiki efisiensi, masih diperlukan banyak langkah langkah komplek TN seperti enukleasi dan insersi, aktivasi oosit dan sinkronisasi antara sel donor dan oosit resipien (Koh dan Atala, 2004). Kegagalan *reprogramming* epigenetik yaitu pola metilasi DNA, modifikasi *histone* dan struktur kromatin secara keseluruhan dari sel somatik tidak diprogram kembali (*reprogramming*) menjadi pola ekspresi embrio, merupakan penyebab kelainan dari sel rekonstruksi. *Reprogramming* epigenetik yang benar menjadi keadaan embrionik (*embryonic state*) mungkin akan membantu efisiensi TN dan menurunkan kejadian sel-sel rekonstruksi yang abnormal (Koh dan Atala, 2004).

2.3.3. *Reprogramming* dalam Transfer Nukleus

Sel-sel dalam tubuh manusia dari satu individu, yang berasal dari "satu sel" embrio mempunyai isi DNA yang sama sehingga informasi genetiknya sama. Namun sel-sel dalam tubuh berdifferensiasi menjadi berbagai jenis sel seperti sel

otot, sel tulang, sel epitel dan lain-lain dan sel-sel dalam satu tubuh tersebut mempunyai diversitas fungsi yang luas. Adanya differensiasi dan diversitas fungsi yang luas ini disebabkan oleh modifikasi *epigenetic imprint* melalui metilasi (Mollard *et al.*, 2002). Mekanisme differensiasi adalah dengan merubah gen (*epigenetic modification*) menjadi gen yang tidak aktif (*imprinted expression*). Hal paling menonjol / utama yang terjadi dalam modifikasi epigenetik dan merupakan proses sentral dari imprinting adalah modifikasi kovalen pada basa sitosin yaitu adanya penambahan grup metil (metilasi) pada posisi 5 dari cincin nukleotida.

Sifat utama dari DNA metilasi adalah pulihnya metilasi pada setiap replikasi sel sehingga pola metilasi pada sel somatik umumnya stabil. DNA yang telah mengalami metilasi gennya tidak aktif (ekspresi) dan kromosomnya stabil (*transcriptional silencing and chromosome stability*) (Dean *et al.*, 2003).

Nukleus sel somatik yang sudah berdifferensiasi, jika dimasukkan kedalam sitoplasma oosit matur (MII) akan terjadi NEBD (*nuclear envelope breakdown*), PCC (*premature chromosome condensation*) dan terjadi de-differensiasi (*remodelling*) (Campbell, 1999; Fulka *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2003).

Fertilisasi merupakan aktivasi sel secara alamiah agar sel melakukan pembelahan sel. Secara artifisial, aktivasi bisa dilakukan secara kimiawi atau aliran listrik. Aktivasi, akan menimbulkan osilasi peningkatan Ca^{2+} dalam sitoplasma, dan Ca^{2+} bersama dengan calmodulin membentuk komplek CaM (*calcium-calmodulin*) yang akan menyebabkan CSF (*cytostatic factor*) inaktif. CSF merupakan protein yang disintesa secara konstan oleh oosit MII (metafase II). CSF berperan mempertahankan agar MPF (*maturation / mitosis / meiosis / M-phase promoting factor*) tetap tinggi. MPF merupakan protein kinase yang terdiri dari subunit *cyclin* B dan p34cdc2. Dengan inaktivasi CSF maka akan merusak MPF sehingga merangsang mitosis dan terjadi pertumbuhan sel. Keberhasilan pertumbuhan sel bergantung pada keberhasilan *remodelling* (*reprogramming*).

Pada *reprogramming* terjadi demetilasi. *Reprogramming* yang tidak sempurna akan menghambat pertumbuhan bahkan kematian sel (Fulka *et al.,* 2001; Hozumi, 2001; Hansis *et al.,* 2004).

2.3.4. Kultur sel Donor.

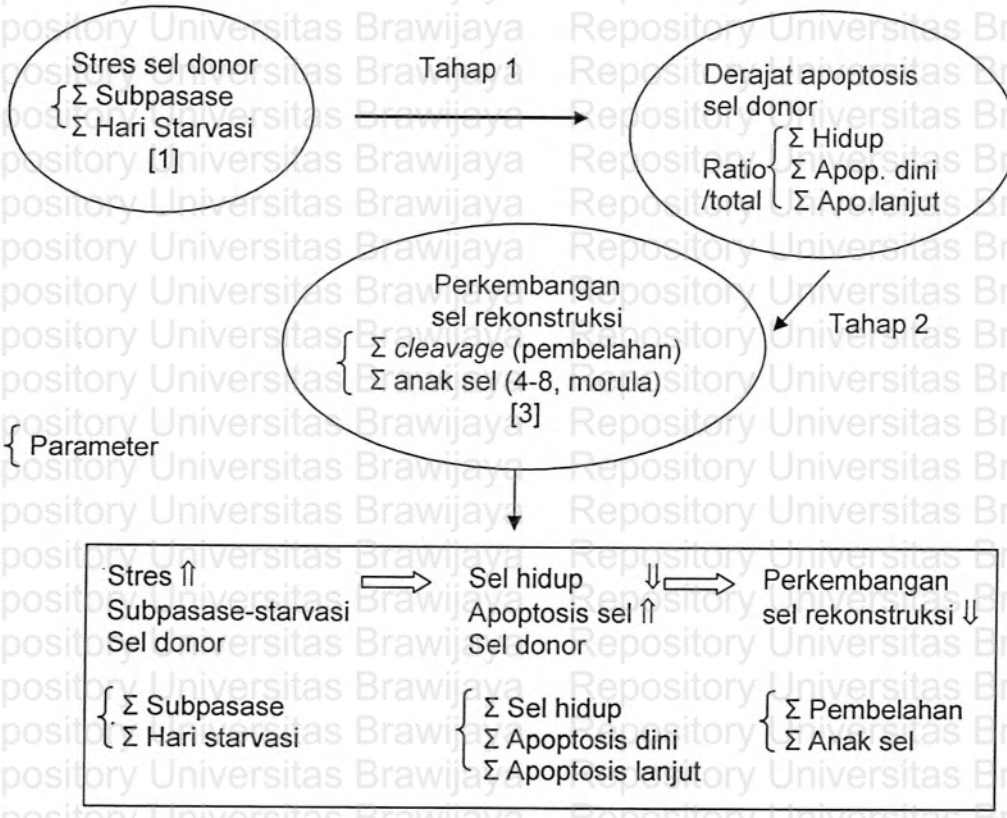
Sudah menjadi asumsi dasar dibidang biologi bahwa sel donor yang dikultur ada pembatasan intrinsik yang tertentu (*fixed*) kemampuan membelahnya dan batas kemampuan membelah ini berhubungan dengan proses penuaan. (Rubin, 1997). Selama terjadi proses pembelahan dalam kultur, terjadi kerusakan berupa peningkatan konsentrasi protein yang abnormal pada intraseluler, meningkatnya mitokondria yang rusak, kerusakan akibat radikal bebas dan penuaan replikasi berupa pemendekan telomer (Kühholzer-Cabot dan Brem, 2002). Penuaan sel sebagai konsekuensi dari pemendekan telomer dan telomer yang sangat pendek tidak dapat lagi mencegah kerusakan dan penyambungan kromosom *end-to-end*. Kondisi kerusakan dan penyambungan kromosom *end-to-end* ini menyebabkan apoptosis (Kühholzer-Cabot dan Brem, 2002). Demikian pula pada kultur starvasi serum, Juga dapat menimbulkan aneuploidi yang selanjutnya menimbulkan apoptosis dan kerusakan dari DNA (Peura, 2001; Urakawa *et al.,* 2004). Kerusakan sel akan menurunkan keberhasilan TNS.

BAB 3: KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep Penelitian

Konsep yang digunakan untuk membangun hipotesis penelitian ini terutama adalah konsep tentang (1) Stres sel donor, (2) Kualitas sel donor, (3) Keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi.

Secara skematis kerangka konsep dan hipotesis penelitian disajikan pada gambar 04.



Gambar 04: Kerangka konsep dan hipotesis penelitian.

a. Stres sel donor.

Subpasase dan starvasi serum merupakan stres bagi sel. Selama terjadi proses pembelahan stres yang terjadi dalam kultur menimbulkan kerusakan

berupa peningkatan konsentrasi protein yang abnormal pada intraseluler, meningkatnya mitokondria yang rusak, kerusakan akibat radikal bebas dan penuaan replikasi berupa pemendekan telomer (Kühholzer-Cabot dan Brem, 2002). Selain itu, sel donor yang dikultur juga ada pembatasan intrinsik yang tertentu kemampuan membelahnya dan batas kemampuan membelah ini berhubungan dengan proses penuaan. (Rubin, 1997). Penuaan sel sebagai konsekuensi dari pemendekan telomer dan telomer yang sangat pendek tidak dapat lagi mencegah kerusakan dan penyambungan kromosom *end-to-end*. Kondisi kerusakan dan penyambungan kromosom *end-to-end* ini menyebabkan apoptosis (Kühholzer-Cabot dan Brem, 2002). Demikian pula pada kultur starvasi serum, Juga dapat menimbulkan aneuploidi yang selanjutnya menimbulkan apoptosis dan kerusakan dari sel (Peura, 2001 ; Urakawa *et al.*, 2004).

Parameter stres sel donor dalam penelitian ini dinyatakan sebagai jumlah subpasase dan hari (lamanya) starvasi serum.

b. Derajat apoptosis sel donor.

Perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS menggambarkan kesempurnaan *reprogrammimg* nukleus sel rekonstruksi. Salah satu faktor yang mempengaruhi kesempurnaan *reprogramming* sel rekonstruksi hasil TNS adalah kualitas sel donor atau faktor sel donor. Faktor faktor sel donor yang telah diketahui mempengaruhi kesempurnaan *reprogramming* sel rekonstruksi hasil TNS meliputi jenis sel donor, sumber sel donor dan fase siklus sel donor. Dari faktor jenis sel donor, fibroblas lebih efisien dibanding sel kumulus, sel *oviduct* maupun sel otot. Dari faktor sumber sel, sel yang lebih muda lebih efisien, sebagai contoh sel fetus lebih efisien dibanding sel dewasa. Dari faktor siklus sel, sel fase G0/G1 lebih efisien dibanding sel pada fase lainnya (Wolf *et al.*, 2001; Kühholzer-Cabot dan Brem, 2002; Urakawa *et al.*, 2004).

Preparasi sel donor untuk keperluan TNS, yaitu subpasase dan kultur starvasi serum, merupakan stres yang dapat menimbulkan perubahan karakteristik sel donor berupa kerusakan sel seperti tersebut pada poin a tersebut diatas dan menimbulkan berbagai derajat apoptosis. Belum jelas bagaimana pengaruh perubahan karakter sel donor (derajat apoptosis) akibat subpasase dan starvasi serum terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS. Parameter derajat apoptosis sel donor yang dipakai pada penelitian ini adalah ratio sel hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut terhadap jumlah keseluruhan sel.

c. Perkembangan sel rekonstruksi.

Pada TNS, nukleus dari sel rekonstruksi yang dihasilkan merupakan nukleus sel somatik yang telah terdifferensiasi. Agar sel rekonstruksi dapat tumbuh normal, maka nukleus sel somatik yang telah terdifferensiasi tersebut perlu terjadi *reprogramming* yaitu perubahan dari nukleus dari sel somatik yang telah terdifferensiasi menjadi sel totipoten kembali yang merupakan sel yang belum terdifferensiasi. Hal utama yang terjadi pada *reprogramming* nukleus donor adalah demetilasi pada basa sitosin DNA untuk memulihkan ekspresi gene dan pertukaran *Histone* (H1) untuk menghapus memori sel (Hansis *et al.,* 2004). Ketidak sempurnaan (ineffisiensi) dari *reprogramming* merupakan penyebab utama masih rendahnya efisiensi dari TNS.

Perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS menggambarkan *reprogramming* nukleusnya (Dean *et al.,* 2003), tetapi *reprogramming* sel rekonstruksi juga bisa dinilai dari marker pluripotensi sel yaitu adanya ekspresi oct-4 dan GCAP dari mRNA yang merupakan marker pluripotensi dari sel manusia dan mencit (Hansis *et al.,* 2004). Parameter dari perkembangan sel rekonstruksi pada penelitian ini jumlah (tingkat) pembelahan dan jumlah anak sel (4-8 sel, morula) dari sel rekonstruksi.

3.2. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian adalah

a. Subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus mempengaruhi derajat apoptosis sel donor.
b. Derajat apoptosis sel donor nukleus mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Secara spesifik, hipotesis penelitian adalah

3.2.1. Hipotesis penelitian tahap 1

a. Peningkatan jumlah subpasase sel donor nukleus menurunkan persentase jumlah sel hidup, meningkatkan persentase sel apoptosis dini dan meningkatkan persentase sel apoptosis lanjut dari sel donor.
b. Peningkatan hari (lamanya) starvasi serum sel donor nukleus menurunkan persentase jumlah sel hidup, meningkatkan persentase sel apoptosis dini dan meningkatkan persentase sel apoptosis lanjut dari sel donor.

3.2.2. Hipotesis penelitian tahap 2

Peningkatan derajat apoptosis sel donor (sel hidup, sel apoptosis dini, sel apoptosis lanjut) menurunkan tingkat pembelahan (*cleavage*), dan tingkat perkembangan (4-8 sel, morula, blastosis) dari sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI

3.3. Kerangka Operasional Penelitian

Kegiatan penelitian secara umum dibagi dalam 2 tahap yaitu tahap pendahuluan dan tahap eksperimental. Tahap pendahuluan optimalisasi teknik IDNI sebagai metode TNS, dinilai integritas sel rekonstruksi yang dihasilkan dan viabilitasnya. Tahap eksperimental ada dua tahap, pertama, kultur sel donor dengan medium standard untuk memproduksi sel donor (sel donor A). Kultur sel donor A dilanjutkan dengan medium starvasi serum untuk memproduksi sel donor (sel donor B) kemudian dilakukan pemeriksaan jumlah sel hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut sel donor A maupun sel donor B. Kedua, eksperimen pengaruh

jumlah sel hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Secara skematis kerangka operasional disajikan pada gambar 05.

Gambar 05: Kerangka operasional penelitian. IDNI : *Intracytoplasmic Direct Nuclear Injection*; SR : Sel Rekonstruksi

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan di laboratorium kultur jaringan Jurusan Biologi FMIPA Unibraw dan Laboratorium swasta di Sawojajar Malang. Kegiatan laboratorium dimulai Bulan Februari 2002 sampai Mei 2005.

4.2 Bahan dan Alat

a. Bahan yang dipakai adalah sebagai berikut

Bahan	Kegunaan
TCM 199 (Gibco)	Medium kultur
FBS (Sigma)	Medium kultur
FSH. Dan LH	Medium Kultur
PBS Dulbeco (Gibco)	Medium Kultur
Penstrep, Gentamycin, piruvat stock	Medium kultur
BSA , TALP HEPES (Sigma)	Medium kultur
Cytochalasin B (Sigma)	Medium kultur sel donor
Cycloheximide	Medium kultur
Mineral Oils / Paraffin oils (Merck)	IVM, manipulasi enukleasi, insersi
Hyaluronidase (Sigma)	Mikromanipulasi
Hoechst dan Propidium Iodide	Pewarnaan
Apopag Kit	Pewarnaan
Kit Imunohistokimia untuk caspase 3	Pewarnaan
Pengadaan COC.	Sitoplasma resipien
Pengadaan Kulit fetus	Sel donor
Petridish, 35 mm, 60 mm	Tempat kultur
Objectglass-coverglass	Pembuatan preparat
Tripsin + EDTA (Sigma)	Trispinasi
Gas CO2.	Untuk inkubator CO2
Pipet pasteur	IVM
Spuit Single use 10 cc	Aspirasi dan pembuatan medium
Parafilm	IVM
Tabung eppendorf	Penyimpanan medium dan hormon
Tip Singgke use	Pippeting
Micro pipette glass (Holding&Injection)	Mikromanipulasi enukleasi, insersi.
Pipet hematocrit	IVM (washing oosit)
NaCl 0,9%.	Pengambilan /transport ovari
Spiritus, Alkohol	Sterilisasi
Film dan cuci cetak, slide	Dokumentasi hasil
DI Water dan aquabidest	Pembuatan medium
Milipore 0.22 um	Filter medium
Alumunium foil	Sterilisasi alat

b. Peralatan yang dipakai adalah sebagai berikut

- Mikromanipulator

  Pada mikromanipulator dipakai sebagai tempat untuk memasang mikro pipet
- Mikroskop
- Mikropipet untuk membuat drop medium 20µl, 50µl, 100µl
- Mikropipet pemegang oosit dan injeksi nukleus

  Dipakai 2 macam mikropipet, yaitu pipet dengan dan tanpa core.

  Pipet dengan *core* dipakai untuk pipet pemegang (*holding*), pipet tanpa *core* dipakai untuk injeksi.
- Micro-electrode puller
- Micro-grinder
- Inkubator CO2
- Laminar air flow

4.3 Metode Penelitian.

Rancangan penelitian adalah eksperimen laboratorium, yang kegiatannya dapat dibagi dalam dua tahap, yaitu tahap pendahuluan dan tahap eksperimental. Selanjutnya, tahap eksperimental dibagi lagi menjadi dua tahap yaitu tahap 1 dan tahap 2. Penelitian pendahuluan adalah penelitian TNS teknik IDNI. Tahap ini dimaksudkan untuk optimalisasi prosedur TNS yang akan digunakan. Penelitian tahap ke 1 adalah preparasi sel donor nukleus yang akan digunakan dalam TNS yaitu penelitian tentang pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus pada derajat apoptosis sel donor. Penelitian tahap 2 adalah penelitian tentang pengaruh derajat apoptosis sel donor nukleus pada perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI. Tahap ini dimaksudkan sebagai upaya untuk meningkatkan efisiensi TNS.

4.4. Penelitian pendahuluan: Pengaruh transfer nukleus sel somatik teknik insersi nukleus langsung ke intrasitoplasma pada viabilitas sel melalui integritas sel rekonstruksi

4.4.1. Pendahuluan

4.4.1.1. Latar Belakang

Teknik TN awalnya dipakai untuk penelitian differensiasi sel pada amfibi. Setelah tahun 1980 an, teknik dikembangkan untuk dipakai pada mammalia. Pada 1983, berhasil ditumbuhkan embrio *murine* setelah menukarkan pronukleus diantara zigot yang difertilisasi. Pada penelitian-penelitian berikutnya pada *mouse* (mencit), pertumbuhan dapat dicapai bila embrio stadium 2 sel yang dipakai sebagai sumber nukleus donor. Embrio stadium lebih lanjut tidak dapat menghasilkan pertumbuhan embrio sehingga pada saat itu disimpulkan bahwa embrio stadium lebih lanjut tidak dapat dipakai sebagai sumber nukleus donor dalam TN. Perkembangan selanjutnya embrio domba dapat ditumbuhkan dari embrio stadium 16 sel sebagai sumber nukleus donor dan oosit enukleasi MII sebagai sitoplasma resipien (Campbell, 1999.).

TN dapat dilakukan dengan dua cara yaitu (1) Nukleus donor diinsersikan kedalam ruang perivitelin oosit M-II yang telah diambil nukleusnya (oosit enukleasi), selanjutnya sel rekonstruksi yang dihasilkan dilakukan fusi dengan menggunakan mesin fusi sel. (2) Nukleus donor diinsersikan langsung ke intrasitoplasma oosit enukleasi, kemudian dilakukan aktivasi pada sel rekonstruksi. Produksi sel rekonstruksi selama ini lebih banyak dilakukan dengan menginsersi nukleus donor ke dalam ruang perivitellin. Teknik IDNI pertama kali pertama kali dilakukan pada mencit dengan hasil yang cukup baik (Wakayama *et al.*, 1998). Teknik IDNI lebih sederhana karena tidak memerlukan fusi sel setelah TN.

Teknik enukleasi dan injeksi / insersi nukleus donor yang efisien adalah sangat krusial untuk bisa menghasilkan sel rekonstruksi dengan ploidi yang normal. Enukleasi oosit M-II resipien pada berbagai spesies mammalia tingkat efisiensinya masih relatif rendah yaitu sekitar 50-90% (Liu *et al.,* 2000; Robl dan Stice, 1989; Kono *et al.,* 1994., Nour *et al.,* 1999).

Aspirasi material kromatin (enukleasi) dari oosit M-II umumnya dilakukan dengan mikromanipulator yang dipasang pada mikroskop *inverted*. Untuk bisa memperoleh tingkat keberhasilan enukleasi yang tinggi, harus diketahui terlebih dahulu posisi material kromatin yaitu berdasarkan visualisasi polar bodi pertama. Aspirasi dilakukan pada sitoplasma yang terletak dekat posisi ekstruksi polar bodi pertama (Liu *et.al.* 2000; Robl dan Stice, 1989; Yang *et al.,* 1992). Enukleasi dilakukan dengan aspirasi 10-25% sitoplasma disekitar polar bodi pertama.

Berdasarkan pertimbangan fisibilitas dan sementara ini belum banyak penelitian yang melakukan TN dengan teknik IDNI menggunakan pipet standard, maka TNS pada penelitian ini dilakukan dengan teknik IDNI. Penelitian tahap ini, adalah optimalisasi prosedur TNS, dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh TNS dengan teknik IDNI terhadap viabilitas sel rekonstruksi yang dihasilkan.

4.4.1.2. Perumusan Masalah

Masalah teknis dari prosedur TNS adalah apakah TNS dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang mempunyai integritas normal dan viabel. Secara spesifik, masalah prosedur TNS adalah

a. Apakah TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang mempunyai integritas normal (tidak lisis, tidak degenerasi, sitoplasma terambil 10-25%) ?
b. Apakah TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang dapat *cleavage* ?

4.4.1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah

a. Mengetahui apakah TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang mempunyai integritas normal (tidak lisis, tidak degenerasi, sitoplasma terambil 10-25%) ?

b. Mengetahui apakah TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang dapat *cleavage* ?

4.4.1.4. Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah

a. Diperoleh metode alternatif produksi sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

b. Data penelitian merupakan informasi dasar yang sangat penting untuk produksi *stem cell* yang singeneik dan bagi kemajuan ilmu kedokteran regeneratif khususnya terapi penggantian sel menggunakan *stem cell* dimasa mendatang.

4.4.2. Kerangka konsep dan Hipotesis

4.4.2.1. Kerangka konsep

Konsep yang digunakan untuk membangun hipotesis penelitian pendahuluan ini adalah konsep tentang (a) Kualitas sitoplasma resipien (b) Integritas sel rekonstruksi (c). Viabilitas sel rekonstruksi. Berbagai konsep tersebut saling berkaitan sebagaimana yang tampak pada gambar 06

a. Kualitas Sitoplasma Resipien

TNS berarti transplantasi nukleus dari sel somatik ke oosit yang belum difertilisasi, yang telah diambil nukleusnya. Oosit yang belum difertilisasi yang diambil nukleusnya (oosit enukleasi) dipakai sebagai sitoplasma resipien (Mollard

et al., 2002). Frekuensi perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS menjadi blastosis meningkat bila yang digunakan adalah oosit matur (Hozumi, 2001).

Sel yang dapat dibakai sebagai sitoplasma resipien pada TNS adalah oosit matur (MII). TNS, sumber nukleus donor dimasukkan ke sitoplasma oosit. Oosit MII mempunyai kadar *Proteasome* dan MPF tinggi. Nukleus sel somatik yang sudah terdifferensiasi jika dimasukkan dalam sitoplasma oosit MII, karena pengaruh MPF akan terjasi NEBD, PCC dan terjadi de-differensiasi (*remodeling*) (Cambell, 1999; Fulka *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2003). NEBD merupakan prasyarat terjadinya *reprogramming* (Hozumi, 2001)

Kadar MPF yang tinggi dari oosit MII dipertahankan oleh aktifitas sitoplasma yang sangat sensitif terhadap kalsium yaitu yang disebut CSF (*cytostatic factor*). Setelah dilakukan aktivasi akan menimbulkan osilasi (kenaikan *intermitten*) kalsium dari cadangan dalam sel (*internal store*) atau dari medium kultur, dan kalsium tersebut bersama calmodulin membentuk kompleks CaM (*calcium-Calmodulin*) menyebabkan inaktivasi CSF dan aktifitas MPF menurun, menimbulkan kondensasi kromosom dan terbentuk pronukleus. Banyak faktor yang mengendalikan replikasi DNA namun pengendali utama adalah terpeliharanya dinding nukleus yang utuh (*intact nuclear envelope*). Dengan kembalinya dinding nukleus karena MPF menurun dan adanya *proteasome* dalam sitoplasma maka terjadi replikasi DNA, pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi (Campbell *et al.*, 1999; Fulka *et al.*, 2001; Hansis *et al.*, 2004).

Dengan demikian, maturasi oosit sangat menentukan kualitas dari sitoplasma resipien. Parameter kualitas sitoplasma resipien pada penelitian ini dinyatakan sebagai ada tidaknya polar bodi I dari oosit.

b. Integritas sel rekonstruksi

TNS dilakukan melalui beberapa langkah, secara garis besar terdiri dari enukleasi (pengeluaran nukleus / material kromatin) dari oosit, yang akan dijadikan sitoplasma resipien, insersi nukleus ke dalam ruang perivitellin oosit enukleasi (oosit yang telah diambil nukleusnya) dan fusi . TNS yang berhasil akan menghasilkan sel rekonstruksi dengan integritas baik dan *viabel*, yang dapat dinilai dari kemampuan membelahnya. TNS yang gagal akan menghasilkan kerusakan integritas sel rekonstruksi. Kerusakan integritas sel rekonstruksi dalam prosedur TNS dapat terjadi sewaktu enukleasi nukleus berupa (1) Degenerasi. (2) Sitoplasma yang diaspirasi melebihi 50%. Pada enukleasi yang sukses, sitoplasma akan nampak mengecil. Apabila terjadi kerusakan pada membran sitoplasma, pada waktu enukleasi, sitoplasma nampak mengecil namun segera menggelembung kembali mencapai ukuran sebelum enukleasi. Oosit yang menggelembung kembali segera setelah enukleasi (mengecil) tersebut disebut mengalami degenerasi.

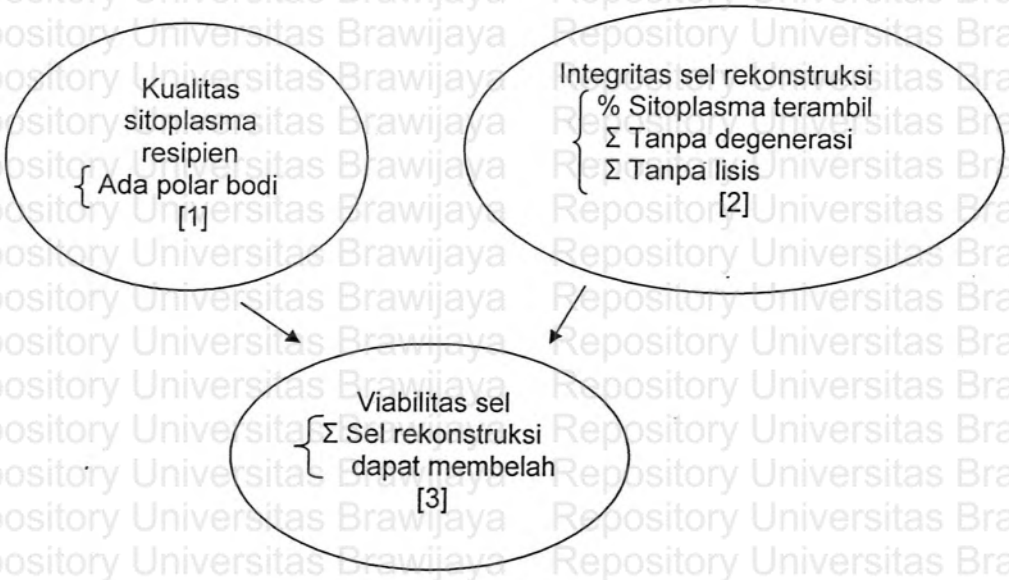
Kerusakan integritas sel rekonstruksi juga bisa terjadi pada saat insersi nukleus, berupa lisis antara lain disebabkan karena ikut masuknya sejumlah tertentu medium bersama nukleus atau karena dinding sel rusak akibat tusukan pipet injeksi untuk insersi nukleus. Selanjutnya sel rekonstruksi hasil TNS dilakukan fusi dengan aliran listrik. Pada penelitian ini, TNS dilakukan dengan teknik IDNI, yaitu nukleus tidak dimasukkan ke ruang perivitellin, tetapi langsung ke intrasitoplasma. Dengan demikian tidak perlu dilakukan fusi, namun dilakukan aktivasi dengan maksud agar terjadi pembelahan sel.

Parameter dari keberhasilan TNS teknik IDNI pada penelitian ini adalah (1) Integritas sel rekonstruksi baik, yang dinyatakan dengan tidak adanya degenerasi,

tidak ada lisi dan sitoplasma terambil 10-15%. (2) Sel rekonstruksi viabel yang dinyatakan dengan ada atau tidak adanya *cleavage* setelah dilakukan aktivasi.

c. Viabilitas sel

Semua bentuk kehidupan dibangun oleh sel, suatu kompartemen kecil yang dibatasi membran yang terisi oleh konsentrasi bahan kimia dalam larutan air. Bentuk yang paling sederhana hanya terdiri dari satu sel. Reproduksi sel dilakukan dengan cara duplikasi isinya kemudian membelah menjadi dua. Siklus pembelahan sel ini merupakan cara fundamental semua bentuk kehidupan untuk berkembang (Alberts *et al.*, 1994). Demikian pula sel rekonstruksi, untuk berkembang, sebagai tanda kehidupan dilakukan dengan pembelahan sel. Parameter viabilitas sel rekonstruksi hasil TNS yang dipakai dalam penelitian ini adalah ada atau tidak adanya pembelahan sel.



Gambar 06 : Kerangka konsep dan hipotesis penelitian

4.4.2.2. Hipotesis

Hipotesis penelitian TNS teknik IDNI adalah.

a. TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang mempunyai

integritas normal (tidak lisis, tidak degenerasi, sitoplasma terambil 10-25%)

b. TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang dapat *cleavage*.

4.4.3. Metode Penelitian

4.4.3..1. Materi

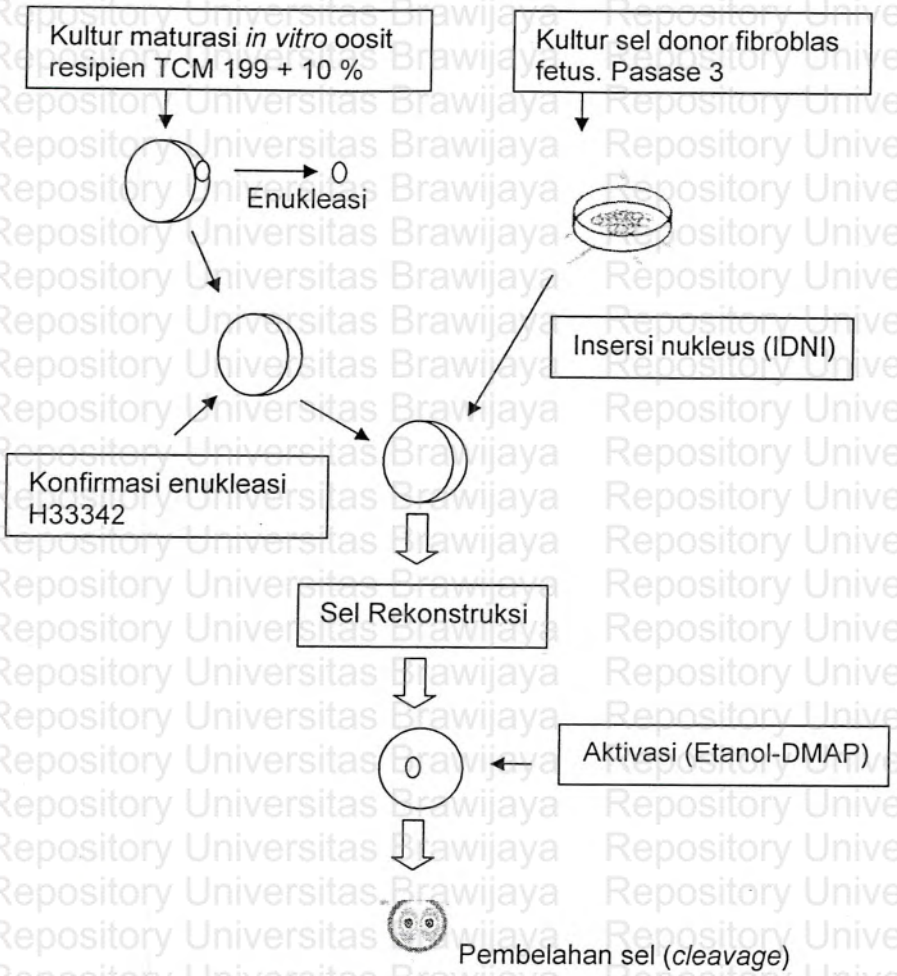
- Oosit matur
- Fibroblas hasil subpasase standard dan kultur starvasi serum.

4.4.3..2. Kerangka operasional

Oosit matur dienukleasi dengan mikropipet didaerah sekitar polar bodi. Oosit yang berhasil diaspirasi material kromatinnya (oosit enukleasi) diinsersi dengan nukleus donor yang telah disiapkan sebelumnya langsung ke intrasitoplasma. Konfirmasi keberhasilan aspirasi material kromatin (enukleasi) atau insersi nukleus dilakukan dengan pengecatan H33342. Sel rekonstruksi yang dihasilkan dilakukan aktivasi artifisial secara kimiawi untuk melihat apakah sel dapat membelah (*cleavage*).

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

Secara skematis, kerangka operasional disajikan pada gambar 07



Gambar 07: Kerangka operasional

4.4.3..3. Metode

a. Enukleasi dan insersi nukleus donor dengan metode IDNI

Maturasi oosit resipien *in vitro* (IVM) dilakukan dalam medium kultur TCM 199 stok + 10% Fet al., Bovine Serum (FBS, Sigma) dengan suplementasi hormon gonadotropin 10 μl FSH stok dan 40 IU LH /10ml medium (Hozumi, 2001) dalam inkubator 5% CO2, temperatur 38,5°C dengan kelembaban maksimum dalam drop 100 μl/10 oosit oosit yang dilapisi parafinoil. Pada oosit hasil IVM, sel-sel kumulus dilepaskan dengan pemaparan sel oosit dalam 1mg/ml hyaluronidase

(Sigma) dalam DPBS (Gibco) selama 10 menit dan dibantu dengan melakukan pemipetan berulang-ulang secara manual (Hozumi, 2001).

Oosit tanpa kumulus yang nampak polar bodinya (PB-1) kemudian ditempatkan dalam 5 μg/ml cytochalasin B (Sigma) dalam PBS yang disuplementasi dengan 10% FBS selama 5-10 menit sampai dilakukan enukleasi.. Enukleasi oosit matur dilakukan dengan melakukan aspirasi sebagian kecil dari volume sitoplasma disekitar PB-1 (10-25% sitoplasma) dengan menggunakan mikropipet Teknik IDNI dilakukan dengan menggunakan pipet standard ukuran diameter luar 100 μm (pipet *holding* / pipet pemegang oosit) untuk memegang oosit dan pipet diameter luar 10-15μm (pipet enukleasi) untuk enukleasi dan pipet diameter luar 8-10 μm (pipet injeksi) untuk insersi. Konfirmasi keberhasilan enukleasi oosit dilakukan pewarnaan dengan Hoechst 33342 5 μg/ml dalam PBS-FBS dan diperiksa menggunakan mikroskop *epifluorescent* (Hozumi, 2001).

b. Aktivasi sel rekonstruksi

Metode aktivasi sel rekonstruksi mengacu pada Ongeri *et al (*2001), yang secara garis besar adalah sebagai berikut: (1) Dilakukan IVM sampai jam ke 24, kemudian dilakukan pelepasan kumulus dari oosit matur dengan 80-160 unit hyaluronidase selama 1 menit dengan melakukan pemipeten berulang. (2). Oosit kemudian dilakukan pencucian dua kali dalam TL-HELPES dan satu kali dalam TCM 199 + 10% FBS. (3). Dilakukan enukleai dan insersi nukleus donor fibroblas pasase 3. (4). Dilakukan inkubasi kembali selama 4 jam pada temperatur 38,5 °C dalam inkubator 5% CO2 dalam medium TCM 199 + 10% FBS dengan kelembaban maksimum. (5). Pada jam ke 28 dari awal kultur dilakukan pemaparan dalam bahan induksi aktivasi oosit yaitu aktivasi dengan Etanol 7% selama 7 menit, dilakukan pencucian (*washing*), kemudian dilakukan aktivasi

kembali dengan 2nM 6 DMAP (*protein kinase inhibitor*) selama 4 jam, dilakukan pencucian dan dikultur selama 48 jam.

Evaluasi pembelahan sel (*cleavage*) dilakukan pada jam ke 48 dan 96 setelah kultur. Peubah yang diamati adalah viablitas sel berdasarkan ada tidaknya pembelahan sel.

4.4.3..4. Peubah yang diamati.

a. Peubah bebas :TNS teknik IDNI

b. Peubah tergantung

- Integritas sel rekonstruksi (tidak lisis, tidak degenerasi, sitoplasma terambil 10-25%)
- Viabilitas sel rekonstruksi (Adanya pembelahan)

c. Peubah kontrol

- Oosit matur
- Aktivasi sel rekonstruksi

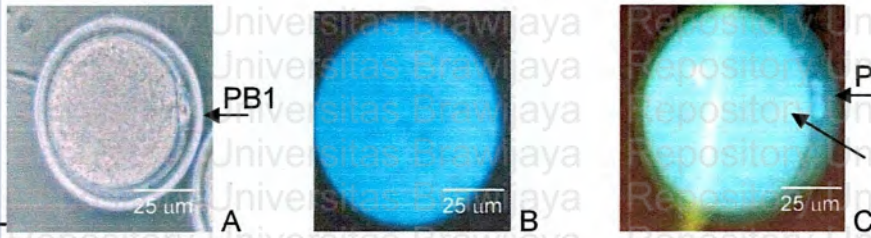
4.4.4. Hasil dan Pembahasan

4.4.4.1. Hasil

Hasil penelitian disajikan pada tabel 5 dan tabel 6

Tabel 5 : Tingkat enukleasi, degenerasi dan insersi nukleus dengan teknik Insersi langsung ke Intrasitoplasma (IDNI)

No	Parameter	Jumlah oosit / total	% keberhasilan
1	Enukleasi		
	Tanpa degenerasi	430 / 591	72,76 %
	Degenerasi	161 / 591	27,24 %
	Konfirmasi enukleasi berhasil	183 / 355	51,55 %
2	Insersi		
	Normal	179 / 391	45,78 %
	Lisis	59 / 391	15,09 %
	Lain lain (rusak, hilang)	153 / 391	39,13 %



Gambar 08: Visualisasi dan konfirmasi keberhasilan enukleasi dengan pewarnaan H-33342. A. Oosit dengan PB-I, cahaya biasa. B. Oosit hasil enukleasi setelah dikonfirmasi, tanpa PB-I dan tanpa kromatin, C. Oosit sebelum di enukleasi, masih menampakkan PB-I dan kromatin (nukleus) tanda panah.

Gambar 09. Sitoplasma resipien A. Oosit hasil enukleasi yang masih utuh (nukleus gagal teraspirasi) B. Ooit hasil insersi yang mengalami lisis. C. Oosit setelah enukleasi dengan pewarnaan H 33342. D. Oosit enukleasi dengan pewarnaan Giemsa. E. Oosit enukleasi normal, cahaya biasa.

Gambar 10: Sel rekonstruksi yang membelah setelah di lakukan aktivasi

Tabel 6 : Tingkat Pembelahan (*cleavage*) sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi

Sel Rekonstruksi					
Dilakukan Aktivasi			Membelah (*Cleavage*)		
Kontrol	Subpasase	Starvasi	Kontrol	Subpasase	Starvasi
63	72	68	28 (44,44%)	12 (16,67%)	7 (10,29%)

Keterangan :

- Subpasase : Sel rekonstruksi hasil TNS menggunakan sel donor hasil subpasase.
- Starvasi : Sel rekonstruksi hasil TNS menggunakan sel donor hasil kultur starvasi serum

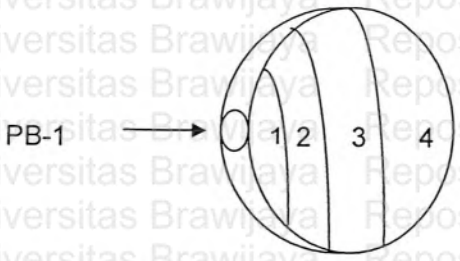
4.4.4.2. Pembahasan

a. Enukleasi

Enukleasi oosit akan lebih mudah dilakukan dengan teknik automatisasi, yaitu teknik manipulasi oosit (memegang, menggerakkan dan memutar) memakai tenaga listrik (Tsukada *et al*., 20001). Manipulasi oosit pada penelitian ini dilakukan secara manual. Enukleasi dilakukan menggunakan pipet standard, diinsersikan pada daerah sekitar polar bodi masuk ke dalam sitoplasma. Selanjutnya sitoplasma diaspirasi dapat dengan tenaga air (*hydraulic pressure*), oli (*oil pressure*) atau tekanan udara (*air pressure*). Pada penelitian ini menggunakan tenaga oli.

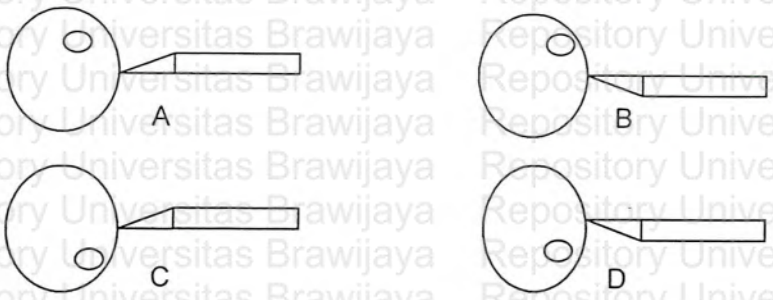
Enukleasi yang ideal pada oosit resipien, seharusnya dilakukan aspirasi sebanyak volume sitoplasma yang sama dengan volume sel donor yang akan diinsersikan, karena akan lebih sesuai bagi perkembangan normal sel rekonstruksi (Zakharchenko et al., 1997). Disisi lain, target enukleasi adalah untuk dapat mengambil material kromatin dari sel resipien yang nantinya akan diganti oleh material kromatin sel donor.

Untuk memperoleh tingkat enukleasi yang baik, maka sangat diperlukan pengetahuan posisi material kromatin dari sel oosit resipien (Attabay *et al.,* 2001). Posisi relatif kromatin terhadap PB-1 dibagi menjadi 4 katagori (Gambar 11). Oosit Matur (M-II) ditandai secara visual dengan adanya ekstruksi PB-1. Pada kondisi ini, maka letak kromatin adalah dekat dengan posisi ekstruksi PB-1 pada ruang perivitellin. Nour dan Takahashi (1999), melaporkan bahwa pada oosit sapi matur dengan posisi kromatin dalam posisi 1 dan 2 dapat dienukleasi dengan baik pada aspirasi sitoplasma sebanyak 20%.



Gambar 11: Skema posisi relatif kromatin terhadap PB-1. 1. Kromatin terletak dekat dengan PB-1; 2. 1/3 sitoplasma dekat PB-1; 3. Kromatin antara ½ dan 1/3 sitoplasma. 4. ¼ sitoplasma jauh dari PB-1.

Hal lain yang perlu diperhatikan untuk meningkatkan tingkat keberhasilan enukleasi adalah dengan memperhatikan arah ketajaman pipet terhadap polar bodi. Material kromatin berada di dekat polar bodi sehingga kemiringan / ketajaman pipet perlu diarahkan ke polar bodi seperti pada gambar 12



Gambar 12: Kemiringan jarum. A. Kemiringan benar. Material kromatin di hemisfer atas. Yang diaspirasi hemisfer atas. B : Kemiringan salah Material kromatin di hemisfer atas. Yang diaspirasi hemisfer bawah. C : Kemiringan salah. Material kromatin di hemisfer bawah. Yang diaspirasi hemisfer atas. D : Kemiringan benar. Material kromatin di hemisfer bawah. Yang diaspirasi hemisfer bawah

b. Insersi nukleus langsung ke intrasitoplasma

Insersi nukleus biasanya dilakukan dengan menginsersikan ke dalam ruang perivitelin. Selanjutnya dilakukan fusi sel dengan rangsangan elektrik. Idealnya insersi sel dilakukan dengan teknik automatisasi yaitu dengan mekanisme *micro movement* (*Piezoelectric impact Drive Mechanism*) (Hozumi, 2001; Tsukada *et al.,* 2001). Pada penelitian ini, insersi dilakukan secara manual langsung ke

intrasitoplasma, sehingga tidak memerlukan fusi sel. Sel donor yang digunakan, sebelumnya telah dilakukan subpasase sebanyak 3 kali. Dari keseluruhan oosit 591 buah yang dilakukan enukleasi, maka sekitar 430 (72,76%) oosit hasil enukleasi yang kemudian diinsersi dengan sel donor, ada 179 (45,78%) bisa dilakukan dengan baik menghasilkan sel rekonstruksi yang normal.

Ada beberapa permasalahan teknis yang dihadapi dengan teknik IDNI yang nantinya berbengaruh terhadap tingkat keberhasilan insersi dan pertumbuhan sel rekonstruksi, yaitu (1) Lisis, karena kerusakan Zp (zona pelusida) oosit atau membran sitoplasma oosit karena kurang sempurnanya lubang (slit) yang dibuat oleh tusukan pipet injeksi / enukleasi sebelumnya. (2). Kontaminasi medium yang masuk bersama nukleus donor ke intrasitoplasma sehingga mengambil ruang di sitoplasma dan (3). Masuknya nukleus donor lebih dari satu. Permasalahan tersebut diduga akan berbengaruh terhadap potensi sel rekonstruksi untuk bisa tumbuh lebih lanjut. Kemungkinan adanya sel donor terinsersi lebih dari satu akan menimbulkan peluang munculnya ploidi yang tidak normal dan hal tersebut akan berpengaruh terhadap perkembangan sel rekonstruksi berikutnya.

Seleksi terhadap sel donor sebelumnya telah dilakukan berdasar sel hidup dan ukuran sel. Pada subpasase 3 sel hidup mencapai 79.55 % (Tabel 7). Sedangkan sel donor yang digunakan adalah yang berukuran kecil yaitu kurang dari 6 μm dengan asumsi bahwa sel tersebut dalam fase G0/G1 (Regio, 2002).

c. Pembelahan sel

Pada TNS, oosit enukleasi yang berhasil dilakukan insersi nukleus pada ruang perivitelin (sel rekonstruksi), dilanjutkan dengan fusi sel memakai aliran listrik. Fungsi aliran listrik ini, selain untuk merangsang fusi sel, sekaligus berfungsi untuk aktivasi. Pada TNS dengan teknik IDNI, setelah insersi nukleus ke dalam sitoplasma, perlu dilakukan inisiasi pembelahan sel dengan aktivasi. Pada

penelitian ini setelah dilakukan aktivasi (Dengan Etanol 10% dan DMAP), sel rekonstruksi dengan nukleus donor sel starvasi maupun growing cell, keduanya dapat membelah. Dari 72 sel rekonstruksi dengan nukleus donornya growing cell, ada 12 sel yang membelah (16,67 %). Sedangkan sel rekonstruksi dengan nukleus donornya sel starvasi, dari 68 ada 7 sel yang membelah (10,29 %). Total dari 140 sel rekonstruksi (nukleus donor sel starvasi dan *growing cell*) ada 19 sel yang membelah (13,57 %).

Oosit yang digunakan dalam TNS ini menggunakan oosit matur (MII). Pentingnya pemakaian oosit matur untuk TNS ini ada dua hal. Pertama, oosit matur tidak konstan mensintesa CSF, yang berfungsi mempertahankan MPF kadar tinggi. Pada oosit immatur masih mensintesa CSF secar konstan. Dengan demikian, setelah dilakukan aktivasi, timbul osilasi Ca^{2+} yang akan merusak CSF, selanjutnya degradasi siklin B dari MPF dan menurunnya MPF akan merangsang mitosis (Hozumi, 2001). Kedua, pada oosit immatur, *germinal vesicle* (GV) penuh dengan *proteasome*. Selama maturasi oosit, GV pecah dan *proteasome* dilepaskan dalam ooplasma dan tersedia untuk infiltrasi sel donor setelah dilakukan TNS. Dengan demikian, sangatlah jelas bahwa bila TNS menggunakan oosit immatur (yang masih mensintesa CSF) dan ikut terbuangnya GV selama aspirasi nukleus dalam enukleasi, secara bermakna akan menurunkan kemungkinan *reprogramming* dan perkembangan sel rekonstruksi setelah TNS (Hozumi, 2001., Sutovsky dan Prather, 2004). Dengan dipakainya oosit yang matur dan dalam aspirasi nukleus selama enukleasi ooplasma yang disedot keluar sekitar 10-25% dan tidak boleh melebihi 50%, maka *proteasome* yang tersisa jumlahnya masih cukup untuk infiltrasi ke nukleus donor sebagai syarat agar sel rekonstruksi dapat membelah. Dengan adanya hasil sel rekonstruksi yang dapat membelah, berarti pemakaian teknik IDNI dalam TNS ini masih menyisakan cukup *proteasome* dalam ooplasma.

4.4.5. Kesimpulan dan Saran

4.4.5.1. Kesimpulan

a. TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang mempunyai integritas normal (tidak lisis, tidak degenerasi, sitoplasma terambil 10-25%)

b. TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang dapat *cleavage*.

c. Teknik IDNI dapat digunakan untuk produksi sel rekonstruksi, namun perlu ketrampilan mikromanipulasi yang baik.

4.4.5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lebih lanjut, untuk membandingkan tingkat keberhasilan produksi sel rekonstruksi dengan tekniik IDNI secara manual dibanding dengan teknik automatisasi.

4.5. Penelitian tahap 1: Pengaruh subpasase dan starvasi serum terhadap derajad apoptosis fibroblas sebagai sumber nukleus donor dalam transfer nukleus sel somatik.

4.5.1. Pendahuluan

4.5.1.1. Latar Belakang

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan TNS adalah variasi ekspresi gen dari sel rekonstruksi hasil TNS. Variasi ekspresi gen sel rekonstruksi sangat dipengaruhi oleh jenis sel donor yang dipakai (Jouneau dan Renardy, 2003). Sel sel vertebrata yang dilakukan subpasase, akan mengalami stress berat dan mengalami kerusakan kumulatif. Subpasase juga menyebabkan sel akan mengalami penuaan (Rubin, 1997).

Sebagai sumber sel donor dalam TNS, fibroblas mempunyai tingkat keberhasilan tinggi karena fibroblas belum jauh terdifferensiasi, mempunyai karakteristik yang masih mendekati *stem cell*. Hal ini konsisten dengan penelitian Cho *et al.*, (2002). Sebagai sumber sel donor dalam TNS, fibroblas mempunyai tingkat keberhasilan yang lebih tinggi dibanding sel otot, kumulus dan *oviduct* (Wolf *et al.*, 2001). Berdasar hal tersebut di atas, sel donor yang dipakai dalam penelitian ini adalah fibroblas. Meskipun telah diketahui subpasase dan starvasi serum meningkatkan keberhasilan TNS, namun belum ada standard berapa kali seharusnya subpasase dan berapa hari dilakukan starvasi serum. Masing masing peneliti melakukan subpasase berbeda. Penelitian ini ingin mengetahui bagaimana pengaruh subpasase dan starvasi serum pada kualitas sel donor pada umumnya, dan derajat apoptosis (sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut) pada khususnya, sebagai sumber nukleus dalam TNS.

4.5.1.2. Perumusan Masalah

Untuk mengetahui pengaruh subpasase dan kadar serum medium kultur terhadap sel somatik fibroblas, yang akan dipakai sebagai sumber nukleus donor

dalam TNS, informasi yang ingin diketahui adalah apakah subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus mempengaruhi derajat apoptosis sel donor.

Secara spesifik, masalah penelitian adalah

a. Apakah pengaruh jumlah subpasase sel donor pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
b. Apakah pengaruh hari (lamanya) starvasi serum sel donor pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.

4.5.1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus terhadap derajat apoptosis sel donor.

Secara spesifik, tujuan penelitian adalah

a. Mengetahui pengaruh jumlah subpasase sel donor nukleus pada ratio jumlah sel hidup, ratio sel apoptosis dini dan ratio apoptosis lanjut dari sel donor.
b. Mengetahui pengaruh hari (lamanya) starvasi serum sel donor pada ratio jumlah sel hidup, ratio sel apoptosis dini dan ratio apoptosis lanjut dari sel donor.

4.5.1.4. Manfaat penelitian

a. Manfaat praktis

- Menghasilkan sel-sel donor dari subpasase yang mempunyai derajat apoptosis paling sedikit (Sel donor A).
- Menghasilkan sel-sel donor (Sel donor B) dari kultur starvasi serum sel donor A yang mempunyai derajat apoptosis paling sedikit
- Diperoleh metode kultur subpasase yang paling optimal untuk dipakai sebagai sumber nukleus donor dalam TNS

- Diperoleh metode kultur starvasi serum sel donor yang paling optimal untuk dipakai sebagai sumber nukleus donor dalam TNS

b. Manfaat teoritis

Data penelitian merupakan informasi dasar yang sangat penting untuk produksi sel donor sebagai bahan untuk memproduksi *stem cell* melalui TNS bagi kemajuan ilmu kedokteran regeneratif, khususnya bidang terapi penggantian sel (*cell replacement therapy*) dimasa mendatang.

4.5.1.5. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian adalah subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus mempengaruhi derajat apoptosis sel donor.

Secara spesifik, hipotesis penelitian adalah

a. Peningkatan jumlah subpasase sel donor nukleus menurunkan ratio jumlah sel hidup, meningkatkan ratio sel apoptosis dini dan meningkatkan ratio apoptosis lanjut dari sel donor.
b. Peningkatan hari (lamanya) starvasi serum sel donor menurunkan ratio jumlah sel hidup, meningkatkan ratio sel apoptosis dini dan meningkatkan ratio apoptosis lanjut dari sel donor.

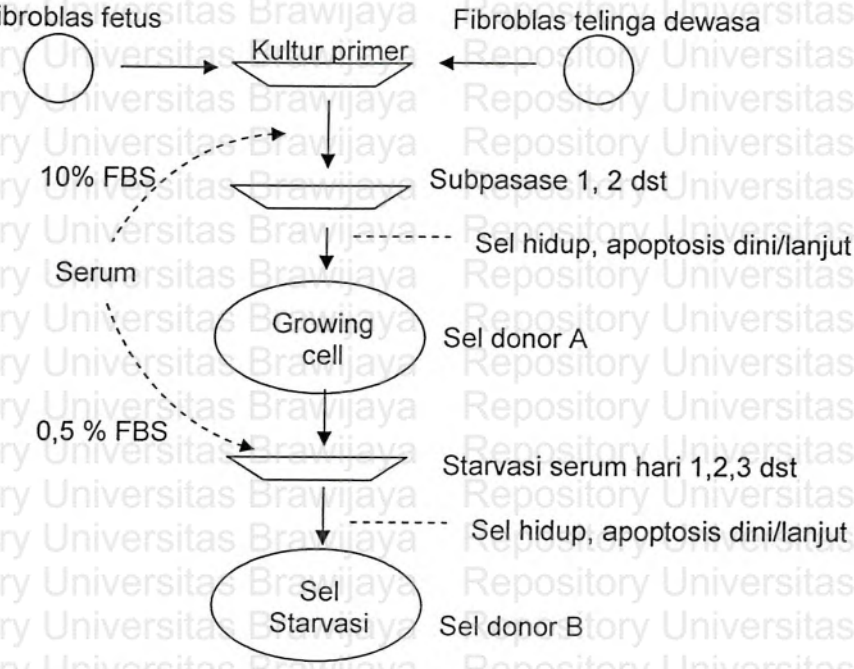
4.5.2. Metode Penelitian

4.5.2.1. Materi

Fibroblas (kulit fetus dan kulit telinga dewasa kambing lokal)

4.5.2.2. Kerangka operasional

Kultur dilakukan dua tahap, pertama dilakukan subpasase dan dinilai subpasase keberapa yang mempunyai persentase jumlah sel hidup paling baik (Sel donor A). Sel donor A selanjutnya dilakukan starvasi serum untuk dinilai persentase jumlah sel hidupnya. Secara skematis tahapan tahapan operasional penelitian disajikan pada gambar 13



Gambar 13: Kerangka operasional

4.5.2.3. Metode

a. Metode Kultur sel donor

Metode kultur sel donor mengacu pada Liu *et al.,* (2000), Nour *et al.,* (2001) dan Kishi *et al.,* (2000) yang secara garis besar adalah sebagai berikut:

Fibroblas primer diambil dari sample fetus kambing dan sel telinga kambing dewasa yang diperoleh dari rumah potong hewan, diambil dari fetus yang masih hidup dan telinga dari kambing dewasa yang disiolasi dan dibawa ke laboratorium dalam termos berisi air hangat 38 °C, dan selanjutnya dilakukan persiapanan inisisasi kultur sel dengan memotong-motong jaringan kulit sekecil mungkin sekitar diameter 1.0 mm.

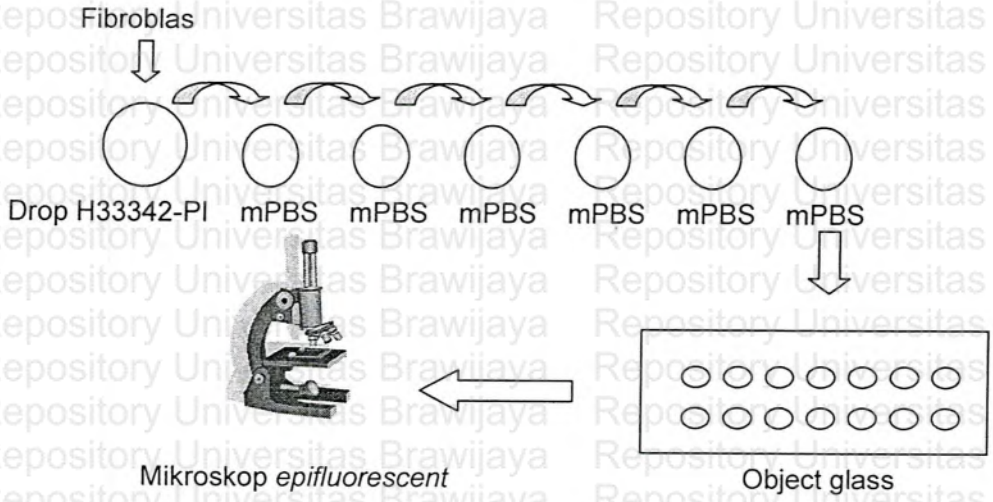
◊ Hasil potongan-potongan disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 5 menit.

- ◊ Setelah bagian supernatan dipisahkan, sel-sel presipitasi di larutkan kembali dalam 50 mL DPBS (-) dan disentrifugasi kembali
- ◊ Perlakuan ini diuang 3 kali
- ◊ Sel-sel presipitasi dilarutkan kembali pada Dulbeco modifikasi dengan Eagle Medium (DMEM, Gibco) yang telah disuplementasi dengan 15 % (v/v) FCS (*Fetal Calf Serum*), 2500 IU/ml Pennicilin (meiji, Japan), 10 mg/ml streptomicin (meiji), 25 ug/ml fungizone (Gibco), 500 ug/ml gentamycin, dan 500 iu /ml polymixin B (Sigma), untuk membuat suplementasi antibiotik yang tinggi DMEM.
- ◊ Setelah kultur 24 jam, medium diganti dengan DMEM yang mengandung 10 % (v/v) FCS, 100 IU/mL penisilin dan 0.1 mg/ml streptomisin (standard suplementasi antibiotik untuk DMEM)
- ◊ Sel dikultur sampai konfluen pada temperatur 37 °C, 5 % CO2 dan kelembaban maksimal.
- ◊ Dilakukan penggantian medium seminggu 2 kali
- ◊ Sistem kultur berikutnya dan metode subpasase mengacu pada beberapa sistem kultur standard (10 % Serum) dan serum starvasi (0.5 % serum).

Sel donor dari kedua macam sumber fibroblas pada setiap kali subpasase dilakukan uji sel hidup dengan melihat persentase sel hidup-mati. Metode yang digunakan adalah menggunakan pewarnaan dengan H 33342-*Propidium Iodide*. Subpasase yang mempunyai persentase jumlah sel hidup paling baik dilakukan pemeriksaan apoptosis lanjut dengan pengecatan fragmentasi DNA menggunakan Apopag Kit (Invitrogen) dan pemeriksaan apoptosis dini dengan Kit Imunohistokimia untuk caspase-3 (SantaCruz).

b. Pewarnaan Hoechst 33342 dan PI (Propidium Iodide)

Fibroblas dimasukkan drop 100 µl yang mengandung Hoechst 33342 dan *Propidium Iodide* selama 10 menit, kemudian dipindah dalam drop 50µl mPBS sebanyak 6 kali, kemudian diamati dibawah mikroskop *epifluorescent*.

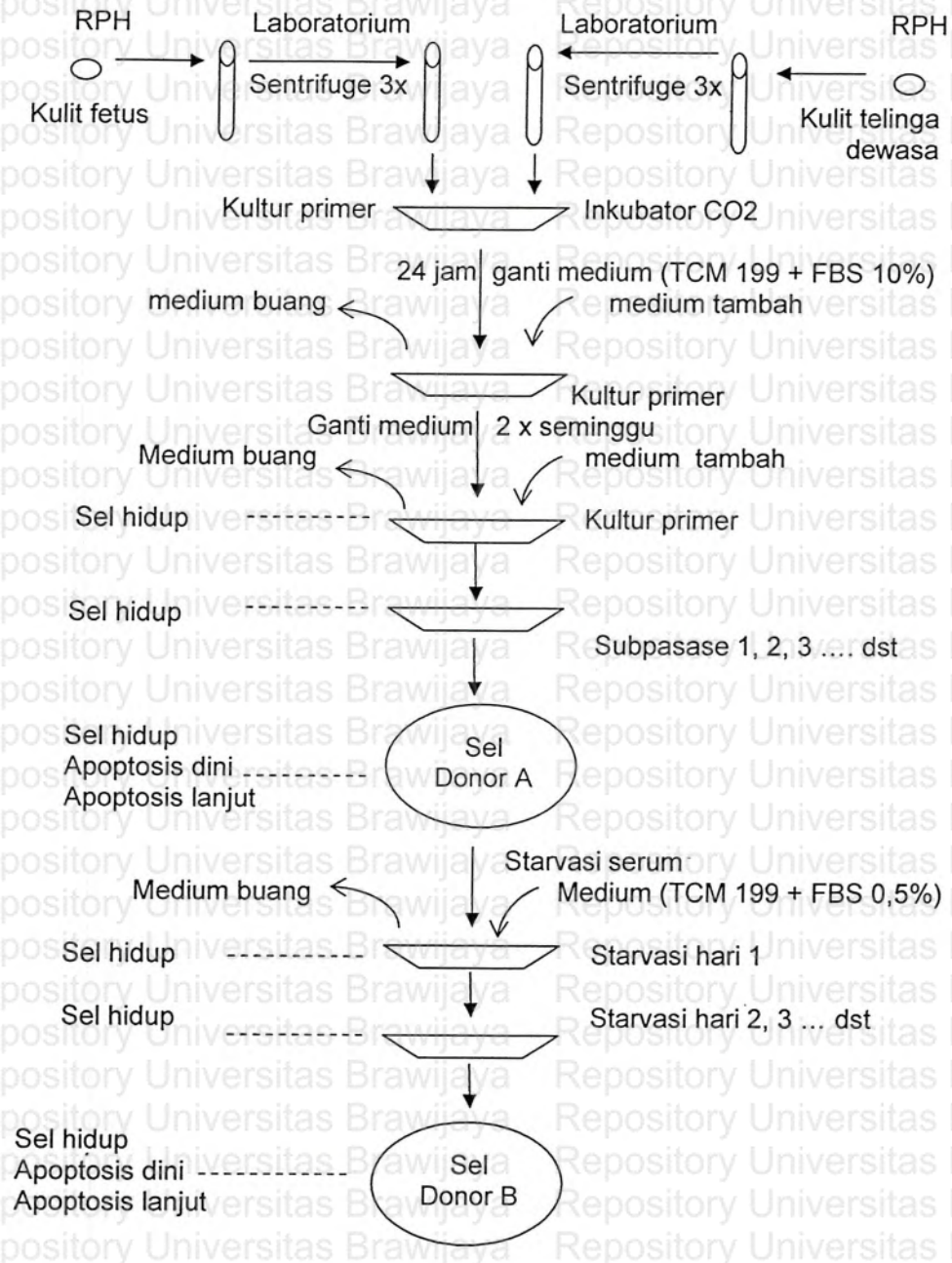


Gambar 14: Pewarnaan Hoechst 33342 dan PI (*Propidium Iodide*)

c. Pemeriksaan apoptosis dini dan apoptosis lanjut

Pemeriksaan apoptosis dini dan apoptosis lanjut dilakukan dengan pengecatan fragmentasi DNA dan pewarnaan Caspase-3 / pemeriksaan imunohistokimia (Lampiran 9 dan 10).

Secara skematis metode penelitian digambarkan sebagai berikut



Gambar 15: Metode penelitian

4.5.2.4. Peubah

a. Peubah bebas

- Jumlah subpasase
- Jumlah hari starvasi serum

b. Peubah tergantung

- Ratio sel hidup dan mati.
- Ratio sel yang mengalami apoptosis dini.
- Ratio sel yang mengalami apoptosis lanjut.

4.5.3. Hasil dan Pembahasan

4.5.3.1. Hasil

Pada kultur standard sampai subpasase 3 mempunyai persentase jumlah sel hidup paling baik. Sedangkan pada kultur starvasi serum, sampai hari 3 persentase jumlah sel hidup masih relatif baik, selebihnya menurun secara drastis.

Tabel 7 : Kultur fibroblas dan jumlah sel hidup hasil kultur standard.

Kultur	Sel hidup (%)	Sampel (n)	Keterangan
Fibroblas fetus			
Primer	89.95 ± 4.16	20	
Subpasase 1	84.65 ± 5.08	20	
Subpasase 2	76.15 ± 1,72	20	
Subpasase 3	79.55 ± 3.93	20	Dilakukan starvasi serum
Subpasase 4	78.3 ± 5.43	20	
Subpasase 5	75.55 ± 5.64	20	
Fibroblas telinga dewasa			
Primer	83.25 ± 3.17	12	Selanjutnya kultur
Subpasase 1	80	1	dihentikan

Tabel 8 : Sel hidup dari kultur standard subpasase 3 yang dilakukan starvasi serum

Hari ke	Sel hidup (%)	Sampel (n)	Keterangan
1	65.55 ± 4.19	20	
2	60.65 ± 5.83	20	
3	56.1 ± 5.94	20	
5	29.1 ± 8.96	20	
6	4.45 ± 3.56	20	

Tabel 9 : Apoptosis dini dan Apoptosis lanjut dari kultur sel donor

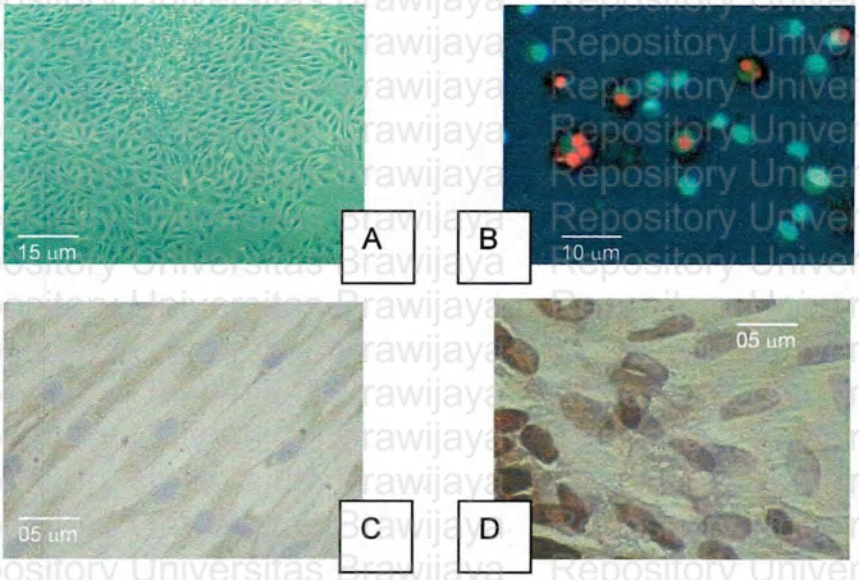
Kultur	Apoptosis lanjut (%)	Apoptosis dini (%)	Ket
Subpasase	11,67 ± 2,08	24,00 ± 6,08	
Starvasi serum	42,33 ± 7,57	41,67 ± 2,08	

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ada bukti kuat terdapat asosiasi antara sistim kultur (subpasase dan starvasi serum) dengan ketiga karakter sel donor (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut.) (Tabel 7 dan 8).

Tabel 10. Hasil analisis statistik asosiasi antara subpasase konfluen dan starvasi serum dengan karaker sel donor.

Sistim Kultur	Karakteristik Sel		
	Apop. Dini (%)	Apop. Lanjut (%)	Sel Hidup (%)
Subpasase	24.00[a]	11.67[a]	79.55[b]
Starvasi serum	41.67[b]	42.3[b]	56.1[a]

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama berarti ada bukti kuat terdapat asosiasi antara sistim kultur dengan karakter sel (P< 0.001).



Gambar 16: Fibroblas. A. Kultur fibroblas konfluen. B. Pemeriksaan sel hidup dengan pengecatan H 33342-*Propidium Iodide*. Sel mati (merah) dan sel hidup (hijau). C. Pemeriksaan apoptosis. Apoptosis dini sitoplasma tercat coklat. D. Pemeriksaan apoptosis lanjut. Apoptosis lanjut nukleus tercat coklat

4.5.3.2. Pembahasan

Penyediaan sel donor dalam TNS dengan dilakukan subpasase dan starvasi serum telah dilakukan banyak peneliti. Namun belum ada standard, berapa kali subpasase sebaiknya dilakukan dan berapa hari starvasi serum dilakukan. Das et al. (2003) melakukan subpasase 3–5 kali, Cho et al. (2001) 6-8 kali, Kühholzer dan Prather (2001) 3-8 kali dan Tao et al (1999) 2-10 kali. Preparasi dilanjutkan dengan menginduksi menjadi sel quiscent dengan cara

MILIK PERPUSTAKAAN Universitas Brawijaya

starvasi serum. Lama starvasi serum juga belum ada standard baku berapa hari perlu dilakukan. Beberapa peneliti melakukan starvasi serum dalam jangka waktu yang berbeda-beda pula. Das et al. (2003) melakukan starvasi serum selama 4-8 hari., Cho et al. (2001) 2-3 hari, Kühholzer dan Prather (2001) 2-6 hari dan Tao et al (1999) 9-13 hari. Hasil perkembangan juga bervariasi. Das et al. (2003) dari 180 sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi, ada 6 (3.3%) terjadi pembelahan, 1 (0.55%) mencapai stadium 4 sel, 2 (1.1%) mencapai stadium morula dan 1 (0.55%) mencapai blastosis). Cho et al. (2001) dari 141 sel rekonstruksi, yang menggunakan sel donor fibroblas kultur standard menghasilkan 122 terjadi pembelahan dan 39 mencapai stadium blastosis. Menggunakan sel donor fibroblas starvasi serum, dari 197 sel rekonstruksi, 184 terjadi pembelahan sel dan 80 mencapai stadium blastosis. Tao et al (1999) dari 54 sel rekonstruksi yang dikultur, terjadi 25 (46,3%) pembelahan, 22 mencapai morula dan 2 mencapai blastosis.

Selain untuk ketersediaan sel donor dan induksi menjadi quiscent, beberapa peneliti tersebut diatas tidak menuliskan alasan mengapa subpasase dilakukan dalam jumlah tertentu dan starvasi serum juga diakukan dalam hari (lamanya) tertentu. Penelitian ini ingin mengetahui pengaruh jumlah subpasase dan lama starvasi serum terhadap derajat apoptosis sel donor dan dimaksudkan nantinya untuk dipelajari kaitannya dengan keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi.

Subpasase berlebihan menimbulkan efek samping kerusakan sel dan apoptosis (Kühholzer-Cabot dan Brem, 2002) dan kerusakan sel akibat efek samping dari subpasase dapat meningkatkan kegagalan TNS (Urakawa *et al.,* 2004). Dengan demikian, preparasi sel donor untuk keperluan TNS ini dilakukan kultur beberapa kali (subpasase) untuk mendapatkan sel yang "baik" dan dalam jumlah sel yang cukup, namun dalam jumlah subpasase yang tidak berlebihan

sebelum banyak menimbulkan efek samping merugikan pada sel. Penilaian sel donor yang "baik" ini dilihat dari persentase jumlah sel hidup dan apoptosis sel. Hasilnya, sampai subpasase 3 masih mempunyai persentase jumlah sel hidup yang masih relatif baik. Selanjutnya subpasase 3 ini dilakukan pemeriksaan apoptosis dini dan apoptosis lanjut, hasilnya ada 11,67 % apoptosis lanjut dan 24% apoptosis dini.

Starvasi serum dilakukan untuk menginduksi sel donor masuk siklus sel fase G0/G1. Meskipun sel donor diluar fase siklus sel G0/G1 ada yang dapat menghasilkan keturunan (Yu *et al.,* 2003), sebagai contoh seperti pada sapi, sel donor diluar fase G0/G1 (*growing cell*) dapat menghasilkan keturunan, (Shiga *et al.,* 1999; Das *et al.,* 2003; Urakawa *et al.,* 2004) namun sel donor fase G0/G1 meningkatkan angka keberhasilan TNS (Campbell *et al.,*1996; Wilmut et al., 1997 , Yu *et al.,* 2003; Urakawa *et al.,* 2004). Dilain fihak, starvasi serum ternyata banyak menimbulkan efek samping kerusakan sel dan kerusakan sel akibat efek samping starvasi serum meningkatkan kegagalan TNS (Peura, 2001; Urakawa *et al.,* 2004). Sampai hari 3 starvasi serum persentase jumlah sel hidup masih relatif baik (56.1%), selanjutnya meningkat dengan cepat. Pada hari 3 starvasi serum, didapatkan apoptosis lanjut sebanyak 42,33 % dan apoptosis dini sebanyak 41,67 %.

Hasil analisis statistik (tabel 10) menunjukkan ada asosiasi bahwa semakin banyak subpasase, akan semakin meningkatkan persentase jumlah sel yang mengalami kematian, apoptosis dini maupun apoptosis lanjut. Demikian pula starvasi serum, mempunyai efek yang sama yaitu semakin banyak lama starvasi serum, akan semakin meningkatkan persentase jumlah sel yang mengalami kematian, apoptosis dini maupun apoptosis lanjut.

4.5.4. Kesimpulan dan Saran

4.5.4.1. Kesimpulan

Tekanan kondisional selama kultur (subpasase dan starvasi serum) mempengaruhi viabilitas dan apoptosis sel donor. Pada proses kultur terjadi peningkatan ratio apoptosis seiring dengan bertambah lamanya kultur dan berkurangnya kadar serum. Hal ini mengindikasikan bahwa keterbatasan serum dalam kultur merupakan stimulator terjadinya apoptosis, namun masih perlu dilihat lebih jauh mekanisme, bagaimana hal ini terjadi.

4.5.4.2. Saran

Berdasarkan kesimpulan yang dihasilkan, disarankan hal-hal berikut

a. Sumber nukleus donor dari kultur standard untuk TNS adalah subpasase 2 atau subpasase 3
b. Sumber nukleus donor dari kultur starvasi serum untuk TNS adalah starvasi serum hari 3.

4.6. Penelitian tahap 2 : Pengaruh derajat apoptosis sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil transfer nukleus sel somatik teknik IDNI (*Intracytoplasmic Direct Nuclear Injection*)

4.6.1. Pendahuluan

4.6.1.1. Latar Belakang

Tingkat keberhasilan produksi sel rekonstruksi hasil TNS masih sangat rendah. Banyak faktor yang berpengaruh terhadap rendahnya efisiensi metode produksi sel rekonstruksi hasil TNS. Dari aspek sel donor yang digunakan, maka faktor-faktor seperti tipe sel donor, preparasi sel donor, *pasase* dan sinkronisasi sel donor-sitoplasma oosit resipien masih memerlukan penelitian-penelitian yang mendalam karena pengaruh faktor-faktor tersebut belum sepenuhnya diketahui (Kato dan Tsunuda, 1992).

Penyebab utama rendahnya keberhasilan produksi sel embrio rekonstruksi adalah masih adanya kekurangsempurnaan *epigenetic reprogramming* sel donor (Yanagimachi, 2002). Sel donor somatik yang telah terdifferensiasi membutuhkan *reprogramming* untuk bisa terjadinya perkembangan sel rekonstruksi yang normal (Kue *et al.,* 2002; Han *et al.,* 2003).

TNS meliputi transfer sel nukleus donor ke dalam sitoplasma resipien (oosit enukleasi). Sumber dan preparasi sel donor yang digunakan merupakan salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan TN. Berbagai sumber sel donor telah digunakan yaitu sel donor segar hasil isolasi (Wakayama *et al.,* 1998), hasil kultur singkat sel donor fetus dan dewasa (Wilmut *et al.,* 1997; Wells *et al.,* 1999; Wells *et al.,* 1998), menggunakan *embryonic stem cell lines* (Wakayama *et al.,* 1999) semuanya telah dibuktikan berhasil digunakan dalam TN.

Sel somatik merupakan sel yang sudah terdifferensiasi dan sel ini dapat pulih kembali menjadi sel yang totipoten kembali (*reprogramming*) bila dimasukkan kembali ke dalam oosit dan memungkinkan terjadinya de-differensiasi (*remodeling*). Keberhasilan berikutnya tergantung pada keberhasilan *epigenetic remodeling* (Dean *et al.*, 2003). Keberhasilan *reprogramming* sel somatik bisa dinilai dari keberhasilan pertumbuhan sel berikutnya (Dean *et al.*, 2003) atau dari marker pluripotensi sel yaitu adanya ekspresi oct-4 dan GCAP dari mRNA yang merupakan marker pluripotensi dari sel manusia dan mencit (Hansis *et al.*, 2004).

Meskipun berbagai macam sel somatik telah dibuktikan dapat tumbuh dan berkembang setelah TN, namun efisiensinya masih rendah. Hal ini diperkirakan sebagai akibat dari kurang sempurnyanya *reprogramming* dari nukleus sel donor somatik yang dipakai sebagai sel donor (Dean *et al.*, 2003; Sutovsky dan Prather, 2004). Dengan demikian penelitian-penelitian yang terkait dengan faktor-faktor sel donor yang berpengaruh terhadap keberhasilan *reprogramming* penting untuk dilakukan lebih lanjut, sehingga pada akhirnya dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk lebih meningkatkan efisiensi TN. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh kualitas sel donor pada *reprogramming* sel rekonstruksi hasil TNS.

4.6.1.2. Perumusan Masalah

Sel donor merupakan salah satu faktor penentu terhadap keberhasilan TNS. Faktor sel donor yang telah diketahui mempengaruhi keberhasilan TNS adalah faktor sumber sel (embrio, fetus, dewasa, tua), jenis sel (fibroblas, *oviduct*, sel otot, kumulus) dan fase sel (Wolf *et al.*, 2001; Kuhholzer Cabot dan Brem, 2002; Urakawa *et al.*, 2004). Masalah utama TNS adalah apakah sel rekonstruksi yang dihasilkan dapat terjadi *reprogramming*. Perkembangan sel rekonstruksi

menggambarkan *reprogramming*. (Fulka *et al.*, 2001; Hansis *et al.*, 2004). Belum banyak penelitian yang mempelajari pengaruh kualitas sel donor, khususnya derajat apoptosis terhadap keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS. Permasalahan dalam penelitian ini adalah apakah derajat apoptosis sel donor mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI ? Secara spesifik, masalah penelitian adalah

a. Apakah derajat apoptosis (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut) sel donor mempengaruhi tingkat *cleavage* sel rekonstruksi hasil TNS teknik IDNI ?
b. Apakah derajat apoptosis (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut) sel donor mempengaruhi tingkat perkembangan (4-8 sel, morula) sel rekonstruksi hasil TNS teknik IDNI ?

4.6.1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh derajat apoptosis sel donor terhadap ingkat *cleavage* dan perkembangan, yang menggambarkan *reprogramming* nukleus sel rekonstruksi. Secara spesifik, tujuan penelitian adalah untuk

a. Mengetrahui pengaruh derajat apoptosis (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut) sel donor terhadap tingkat *cleavage* sel rekonstruksi hasil TNS teknik IDNI ?
b. Mengetrahui pengaruh derajat apoptosis (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut) sel donor terhadap tingkat perkembangan (4-8 sel, morula) sel rekonstruksi hasil TNS teknik IDNI ?

4.6.1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah

a. Menambah khasanah keilmuan tentang pengaruh derajat apoptosis sel donor terhadap keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS yang menggambarkan *reprogramming* nukleus.

b. Data penelitian merupakan informasi dasar yang sangat penting bagi produksi *stem cell* untuk terapi penggantian sel (*cell replacement therapy*) di masa mendatang.

4.6.1.5. Hipotesis

Hipotesis penelitian adalah derajat apoptosis sel donor mempengaruhi ingkat *cleavage* dan perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI. Secara spesifik, hipotesis penelitian adalah

a. Peningkatan ratio sel hidup meningkatkan tingkat *cleavage* sel rekonstruksi

b. Peningkatan ratio apoptosis dini dan ratio apoptosis lamjut menurunkan tingkat *cleavage* sel rekonstruksi hasil TNS.

c. Peningkatan ratio sel hidup meningkatkan tingkat perkembangan sel rekonstruksi

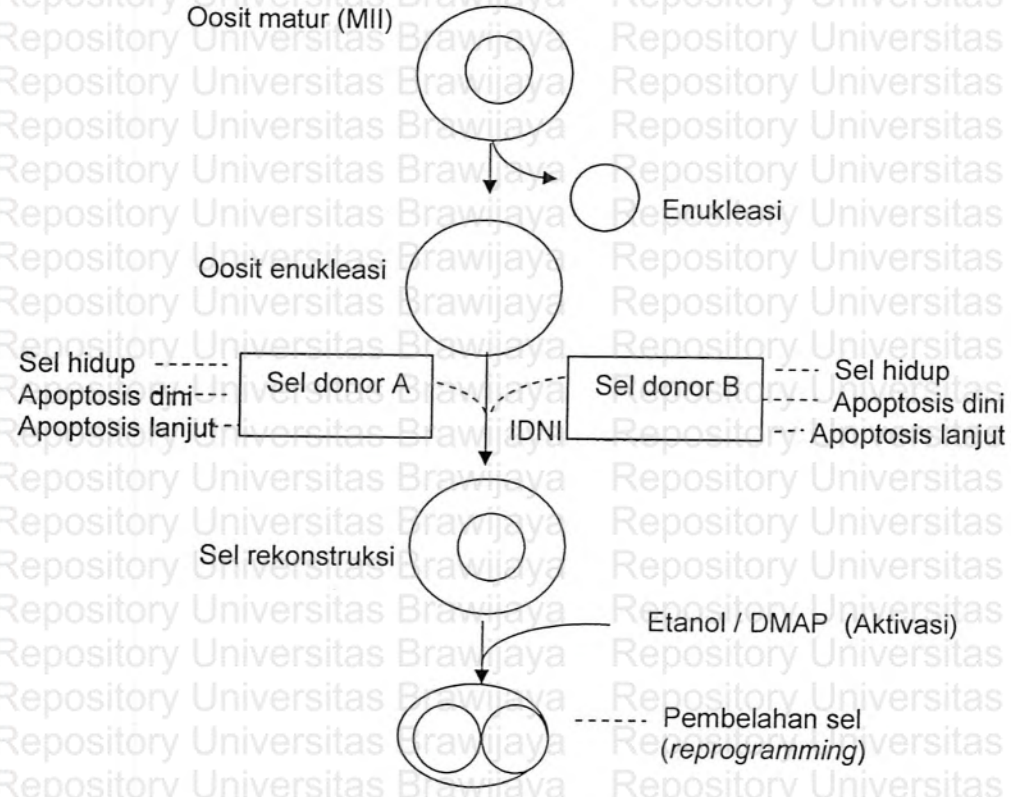
d. Peningkatan ratio apoptosis dini dan ratio apoptosis lamjut menurunkan tingkat perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS.

4.6.2. Metode Penelitian

4.6.2.1. Materi

Fibroblas hasil kultur sel donor penelitian tahap 1

4.6.2.2. Kerangka Operasional



Gambar 17. Kerangka Operasional

Sumber nukleus donor ada dua macam yaitu sel donor A dan sel donor B (hasil percobaan bab 5) ditransfer ke oosit enukleasi MII. Sel rekonstruksi yang dihasilkan dari masing-masing kelompok dilakukan aktivasi dan kultur untuk melihat *reprogramming* sel rekonstruksi hasil TNS, didasarkan atas adanya pembelahan dan perkembangan sel rekonstruksi. Secara skematis kerangka operasional disajikan pada Gambar 17.

4.6.2.3. Metode

a. Enukleasi dan Insersi sel donor

Sesuai dengan enukleasi dan insersi pada penelitian pendahuluan.

b. Aktivasi Sel Rekonstruksi

Sesuai dengan aktivasi sel rekonstruksi pada penelitian pendahuluan.

4.6.2.4. Peubah.

a. Peubah bebas

- Ratio jumlah sel donor hidup
- Ratio jumlah sel donor apoptosis dini
- Ratio jumlah sel donor apoptosis lanjut

b. Peubah tergantung.

- Adanya pembelahan sel rekonstruksi
- Jumlah pembelahan sel rekonstruksi, yang diukur berdasarkan klasifikasi jumlah anak sel, yaitu
  - Stadium 4-8 sel
  - Stadium Morula
  - Stadium blastosis

4.6.3. Hasil dan Pembahasan

4.6.3.1. Hasil

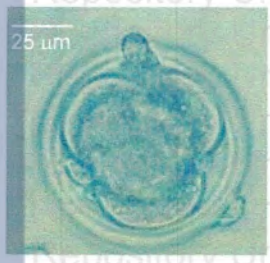
Hasil aktivasi sel rekonstruksi menggunakan sel donor A, yaitu sel donor fibroblas fetus subpasase 3 dan fibroblas fetus starvasi serum disajikan pada tabel 11 dibawah ini. Induksi aktivasi pada penelitian ini digunakan ethanol 7 % dikombinasikan dengan 6 –DMAP, sementara sebagai kontrol digunakan sel parthenogenesis hasil aktivasi oosit M-II.

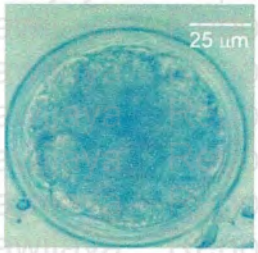
Tabel 11 : Aktivasi, pembelahan sel (*cleavage*) dan pertumbuhan sel rekonstruksi.

Kontrol Parthenogenesis					Perlakuan									
					Sel Donor A					Sel Donor B				
Oosit	2	4-8	M	B	R	2	4-8	M	B	R	2	4-8	M	B
547	222	104	51	0	125	19 (15,2%)	3 (0,8%)	3 (0,8%)	0	118	15 (12,7%)	7 (5,93%)	0	0

Keterangan
2: Stadium pertumbuhan 2 sel
4-8: Stadium pertumbuhan 4-8 sel
M: Stadium pertumbuhan mencapai Morula
B: Stadium pertumbuhan mencapai Blastosis.
R: Sel Rekonstruksi

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tingkat pembelahan sel rekonstruksi masih cukup rendah yaitu 12,7% pada sel starvasi dan 15,2% pada sel donor konfluen (subpasase). Pada sel donor konfluen dihasilkan sel hingga fase morula sementara pada sel starvasi serum hanya mampu berkembang hingga 4-8 sel (Gambar 18).





Gambar 18 : Pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi.

Hasil analisis statistik pada pengaruh karakteristik sel donor (sel hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut) terhadap pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi dengan menggunakan fibroblas hasil subpasase konfluen dan starvasi serum menunjukkan adanya asosiasi yang kuat. Namun demikian, kultur terhadap sel rekonstruksi dalam medium dasar TCM199, belum mampu menghasilkan sel yang mencapai blastosis. Pada kelompok sel donor dengan sistim kultur starvasi serum bahkan pertumbuhannya hanya mencapai tahap 4-8 sel (tabel 12.)

Tabel 12. Hasil analisis statistik asosiasi antara sistim kultur terhadap pembelahan dan perkembangan sel rekonstruksi.

Sistim kultur	Pertumbuhan Sel Rekonstruksi			
	2 sel	4- 8 sel	Morula	Blastosis
Subpasase	19^b	3^a	3^b	0^a
Starvasi serum	15^a	7^b	0^a	0^a

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama berarti terdapat asosiasi yang kuat ($P< 0.001$).

4.6.3.2. Pembahasan

Tingkat keberhasilan TN yang relatif masih sangat rendah seperti dilaporkan dari banyak penelitian sangat ditentukan oleh beberapa faktor diantaranya adalah maturasi oosit, kesesuaian fase nukleus donor dan sitoplasma resipien atau sinkronisasi siklus sel (Keefer *et al.,* 2001). Sementara suatu *reprogramming* sel yang tidak sempurna akan bisa menyebabkan kematian sel rekonstruksi dan tidak berkembangnya sel rekonstruksi.

Reprogramming sel merupakan mekanisme kompleks yang terjadi setelah dilakukan TN. Menurut Jouneau dan Renardy, (2003) definisi *reprogrammning* adalah dominasi molekuler dari satu tipe sel tertentu terhadap sel lainnya, sehingga terjadi tranformasi nukleus berubah menjadi tipe yang dominan. Dalam konteks TN, definisi ini sangat sesuai. Insersi nukleus sel somatik ke suatu oosit (tipe dominan) dapat menghasilkan kelahiran hidup. Hal tersebut menunjukkan peran yang menentukan dari sitoplasma oosit dan pentingnya transformasi nukleus menjadi sel totipoten agar dapat tumbuh (Jouneau dan Renardy, 2003).

Fibroblas fetus dipilih sebagai sumber sel donor dalam penelitian ini karena sel ini mempunyai potensi yang tinggi dalam kultur dan proses yang lebih lama jika diperlukan (Keefer *et al.,* 2001). Pada penelitian ini dicobakan sel donor hasil starvasi serum agar diperoleh sel donor G0/G1 (Cambell *et al.,* 1996), karena diharapkan bahwa sel donor pada fase ini lebih mudah menyesuaikan untuk

terjadinya suatu *reprogramming* dibandingkan dengan sel fase yang lain (Cambell *et al.,* 1996. Zakhartchenko *et al.,* 1999).

Berbeda dengan kloning yang bertujuan memproduksi kopi organisme yang secara genetik hampir sama, TNS bertujuan memproduksi *stem cell* untuk keperluan kedokteran regeneratif (Jouneau dan Renardy, 2003). TN diartikan sebagai insersi nukleus asing ke oosit matur yang telah dienukleasi. *Reprogramming* merupakan mekanisme yang komplek yang terjadi setelah TN.

Perkembangan dan differensiasi dari sel rekonstruksi hasil TN terdiri dari beberapa tahap, (1) Pembelahan pertama dan aktivasi *genome* (*First cleavages and embryonic genome activation*) (2) Pembentukan blastosis (3) Gastrulasi (4) Pembentukan plasenta (5) Pertumbuhan post-natal. Modifikasi epigenetik, dimulai pada stadium pertama (Pembelahan pertama dan aktivasi *genome*). Dengan demikian, salah satu tantangan dalam tahap awal perkembahngan sel rekonstruksi hasil TN adalah menekan pola ekspresi somatik dan mengaktivasi ekspresi embrionik secara benar. Perubahan epigenetik berupa *reprogramming* dari sel rekonstruksi berarti ada perubahan epigenetik menuju pada pemulihan kearah keadaan totipotensi (Jouneau dan Renardy, 2003)

Indikator untuk menilai keberhasilan *reprogramming* dapat dinilai dari marker pluripotensi sel yaitu adanya ekspresi faktor transkripsi Oct-4 dan GCAP (Hansis *et al.,* 2004) atau dari pertumbuhannya (Fulka *et al.,* 2001; Hansis et al., 2004). Pada penelitian ini dinilai tingkat pertumbuhannya. Tingkat pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TN menggambarkan *reprogramming* (Fulka *et al.,* 2001; Hansis *et al.,* 2004). Sel donor A dan sel donor B pada penelitian ini yang dikultur dengan kadar serum berbeda memberikan hasil pertumbuhan yang berbeda. Sel donor yang dilakukan starvasi serum hanya mampu sampai stadium 4-8 sel, sedangkan sel donor yang tidak dilakukan starvasi serum mampu mencapai

stadium yang lebih tinggi. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa kadar serum medium kultur sel donor mempengaruhi *reprogramming* yang dilihat dari adanya pembelahan sel. Untuk pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TN, kadar serum standard lebih baik dibanding serum starvasi. Sel donor A yang hidup 79.55 % dan sel donor B 56.1 %. Disimpulkan bahwa sel donor nukleus untuk TN yang mempunyai persentase sel hidup banyak menghasilkan sel rekonstruksi yang mempunyai tingkat pembelahan dan pertumbuhan yang lebih baik.

Ditinjau dari aspek molekuler, pada *reprogramming* terjadi interaksi antara nukleus (*histone* dan DNA) dengan sitoplasma (Dean *et al.*, 2003; Hansis *et al.*, 2004) Setelah TN dan juga pada ICSI (intracytoplasmic sperm injection) pada mencit, *Histone* H1 sel somatik dalam waktu 60 detik digantikan oleh *histone* H1 dari oosit. Setelah stadium 2 atau 4 sel pertukaran *histone* terbalik kembali. *Histone* H1 dari oosit diganti kembali dengan *histone* H1 embrio. Hal ini merupakan konsekuensi dari dimulainya transkripsi dan translasi dari gene yang menyandi H1 embrio dan terbatasnya waktu paruh (half life) dari *histone* H1 oosit. Hal ini menunjukkan bahwa *reprogramming* sel donor nukleus pada TN sama dengan *reprogramming* pada nukleus sperma setelah fertilisasi secara alamiah (Hansis *et al.*, 2004). Hubungan dari *histone* dengan *reprogramming* adalah bahwa modifikasi *histone* dan protein kromatin lainnya seperti homolog grup Polycomb (Pcg) berkaitan dengan sistim memori sel dan berperanan sebagai *repressor* transkripsi. (Dean *et al.*, 2003). Aktivitas *reprogramming* pada DNA meliputi demetilasi (Dean *et al.*, 2003). Hillangnya metilasi DNA spesifik yang terjadi tanpa disertai replikasi DNA disebut demetilasi aktif. Mekanisme demetilasi aktif yang terjadi pada penelitian *in vitro* meliputi (1) Hilangnya grup 5-metil dari sitosin (2) Hilangnya basa sitosin-metil itu sendiri (dengan cara glikosilasi) (3) Hilangnya sejumlah nukleotida (*nucleotide excision repair*). Proses

ini pada fertilisasi alamiah jelas terjadi pada *genome* paternal sedangkan pada sel-sel germinativum primordial belum jelas (Dean *et al.*, 2003).

4.6.4. Kesimpulan dan Saran

4.6.4.1. Kesimpulan

Keberhasilan TNS sangat dipengaruhi kondisi sel donor nukleus. Pada proses kultur (sel donor nukleus), terjadi proses apoptosis yang menyebabkan penurunan kualitas nukleus. Tingkat / derajat apoptosis mempengaruhi kualitas nukleus donor, dengan demikian apoptosis lanjut pada sel donor nukleus sangat tidak menguntungkan untuk dipakai sebagai sel donor nukleus.

Berbagai macam tekanan kondisional selama kultur (subpasase dan starvasi serum) ternyata tidak menghilangkan kemampuan nukleus dari sel donor untuk TNS. Ini terbukti dari kemampuan sel rekonstruksi hasil TNS menggunakan sel donor nukleus subpasase dan stravasi serum yang masih dapat *cleavage* dan bahkan dapat mencapai perkembangan sampai stadium morula.

4.6.4.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini maka disarankan perlunya dilakukan analisis lebih lanjut pada tingkat seluler dan molekuler sel donor yaitu

a. Pengaruh derajat apoptosis pada proses *reprogramming* dengan menilai proses secara molekuler yaitu kesempurnaan hasil *reprogramming* nukleus sel rekonstruksi dengan melihat marker totipotensi (ekspresi oct-4 dan GCAP)
b. Kerusakan kromosom dan sitoplasma sel donor karena pengaruh sistim kultur, dan pengaruhnya pada keberhasilan *reprogramming* sel rekonstruksi secara molekuler.

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN UMUM

5.1. Hasil Umum.

Hasil pengamatan terhadap karakteristik sel donor pada kedua jenis sistim kultur dan pembelahan / pertumbuhan sel rekonstruksi yang dihasilkan disajikan pada tabel 13 berikut.

Tabel 13: Sistim kultur, karakteristik sel donor, pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil IDNI.

Sel Donor				Pertumbuhan Sel Rekonstruksi			
Sistim kultur	Karakteristik	Jumlah sel / total	IDNI	2 sel	4-8 sel	M	B
Subpasase standard / sel donor A	Apopt. dini Apopt lanjut Sel hidup	72/300 (24%) 35/300 (11,67%) 1591/2000 (79,5%)	125	19	3	3	0
Starvasi serum / sel donor B	Apop. dini Apop. lanjut Sel hidup	125/300 (41,67%) 127 / 300 (42,3%) 1122/2000 (56,1%)	118	15	7	0	0

Hasil analisis statistik menggunakan tabel kontigensi (likelihood) terhadap (1). Pengaruh sistim kultur (subpasase dan starvasi serum) sel donor dengan ketiga karakter sel donor (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut.) (2). Pengaruh sistim kultur (subpasase dan starvasi serum) sel donor dengan pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TNS dan (3). Pengaruh ketiga karakter sel donor (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut.). dengan pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TNS, dengan menggunakan fibroblas hasil subpasase konfluen dan starvasi serum menunjukkan adanya asosiasi yang kuat ($p < 0,01$).

5.2. Pembahasan Umum

Penelitian eksperimental laboratoris pengaruh subpasase dan starvasi serum pada karakteristik sel donor.

Penelitian eksperimental laboratoris pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor pada karakteristik sel donor menggunakan fibroblas fetus dan fibroblas kulit telinga kambing lokal dewasa. Digunakan fibroblas karena faktor efektivitas seperti telah dijelaskan dalam bab pendahuluan. Digunakan kambing karena (1). Faktor fisibilitas. (2). Subpasase atau starvasi serum berpengaruh pada karakteristik sel donor, selain melalui faktor perubahan genetik juga melalui perubahan karena proses penuaan atau pemendekan telomer (Martin, 1994; Kühholzer-Cabot dan Brem, 2002) dan sequence telomer kambing mirip dengan manusia. Diharapkan perubahan karakteristik sel donor akibat pengaruh atau pemendekan telomer mempunyai efek yang sama dengan fibroblas manusia. Telomer merupakan ulangan sequence DNA dan protein pembentuk strukturnya yang terletak di ujung kromosom dari organisme eukariotik. Sequence DNA telomer adalah DNA noncodon, yang berisi ulangan 5'-TTAGGG-3' (Blackburn dan Gall, 1978 *cit.* Yang, 2000). Sequence ini sangat konservatif dan sama pada semua vertebrata (Zakian, 1995 *cit.* Yang, 2000). Meskipun sequence telomer sangat konservatif pada vertebrata, namun, masing-masing spesies mempunyai variasi spesifik dalam hal besarnya. Pada manusia sebesar 5–20 kilobase (kb); biri-biri 5–50 kb dan mencit 20–150 kb (Shay dan Wright, 2000 *cit.*. Ku¨hholzer-Cabot dan Brem, 2002; Kierszenbaum, 2000 *cit.*. Ku¨hholzer-Cabot dan Brem, 2002). Telomer berfungsi memelihara kromosom dengan cara melindungi termini kromosom dari degradasi, fusi rekombinasi berlebihan yang terjadi selama mitosis. Kecuali pada sel-sel germinativum dan hampir semua sel kanker, telomer sel somatik akan memendek setiap kali pembelahan atau replikasi DNA

sampai mencapai titik kritis yang tidak dapat melindungi lagi termini DNA. Pemendekan telomer *in vitro* maupun invivo berhubungan dengan umur sel (Yang, 2000; Mollard *et al*., 2002). Diperkirakan pemendekan telomer menyebabkan penuaan sel *in vitro* dan jika setelah terjadi pembelahan sel terjadi pemendekan telomer yang mencapai titik kritis, sel akan berhenti membelah. Panjang telomer yang sangat pendek (mencapai titik kritis) menyebabkan sel tidak dapat lagi mencegah kerusakan dan fusi antar kromosom yang akhirnya menimbulkan apoptosis.(Shay dan Wright, 2000 *cit*.. Ku¨hholzer-Cabot dan Brem, 2002).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin banyak subpasase ratio sel hidup cenderung menurun. Ratio sel hidup pada kultur primer 89.95 ± 4.16, subpasase 1 sebesar 84.65 ± 5.08 subpasase 2 sebesar 76.15 ± 1,72 subpasase 3 sebesar 79.55 ± 3.93, subpasase 4 sebesar 78.3 ± 5.43 dan subpasase 5 sebesar 75.55 ± 5.64. Namun secara statistik penurunan ratio sel hidup tidak bermakna meskipun menurut Yang (2000) panjang dan jumlah telomer DNA pada kultur sel menurun sesuai serial pasase *in vitro*. Tidak bermaknanya hubungan sel hidup dengan jumlah subpasase ini diduga karena sampai dengan subpasase 5 belum cukup banyak fibroblas yang panjang telomernya memendek sampai mencapai titik kritis yang dapat menyebabkan sel berhenti membelah dan menimbulkan apoptosis. Diperlukan subpasase yang lebih banyak untuk membuktikan adanya hubungan jumlah sel hidup dengan jumlah subpasase.

Kontaminasi merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur. Pada awalnya, fibroblas yang dipakai dalam penelitian ini adalah fibroblas fetus dan kulit telinga dewasa. Prosedur yang dipakai selama ini, untuk menghindari kontaminasi, selain dengan penyinaran UV pada laminar air flow, dipakai spray

alkohol 70%. Hasilnya dari beberapa kali kultur primer fibroblas dewasa, semua terjadi kontaminasi kuman. Kultur primer fibroblas fetus dapat menghasilkan kultur bebas kuman, namun masih ada beberapa yang mengalami kontaminasi.

Pemakaian fibroblas fetus sebagai donor nukleus mempunyai efisiensi waktu yang lebih baik dibanding fibroblas kulit dewasa. Pada penelitian ini, keadaan kultur konfluen, bisa dipapai rata-rata dalam minggu ke 2 pada fibroblas fetus, sedangkan kulit dewasa rata-rata pada minggu ke 4. Hal ini konsisten dengan teori yang ada bahwa sifat sel yang mengalami penuaan yang paling umum dan paling konsisten, dengan hanya sedikit pengecualian, adalah penurunan tingkat proliferasi sel (Rubin, 1997). Juga apabila dipakai sebagai sumber nukleus donor, berbeda apakah berasal dari sel embrio, fetus, muda atau dewasa. Sel yang lebih tua, lebih kurang potensinya sebagai sumber nukleus donor (Wolf *et al.*, 2001)

Sel donor subpasase 3 pada penelitian ini dilakukan induksi agar menjadi keadaan *quiescence*. Cara induksinya adalah dengan melakukan *serum–deprivation* atau *serum–starvation* sehingga siklus sel dapat dihentikan pada fase Go (Campbell, 1996; Campbell, 1999). Sebagaimana sel-sel donor mamalia , perkembangan siklus sel setelah sitokinesis, sel membutuhkan mitogen (growth factors) untuk bisa berkembang sampai fase G1. Penghilangan signal mitotik dengan starvasi serum akan menyebabkan sel yang dalam fase G1 akan keluar dari siklus sel dan berhenti dalam keadaan tidak membelah dalam kondisi aktifitas metabolis yang rendah yang disebut Go (Krogstad, 1989 ; Tieqiao, 1999 *cit.* Reggio, 2002). Sel donor dalam kondisi fase Go, apabila dipakai sebagai sumber nukleus dalam TNS, nukleus akan lebih mudah dimodifikasi oleh berbagai faktor dari sitoplasma oosit resipien, atau menjadi lebih mudah menangkap signals sitoplasma, sehingga memudahkan terjadinya *reprogramming* nukleus (Campbell, 1999). Adanya *reprogramming* nukleus ini

sangat penting karena tingkat perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS sangat tergantung pada *reprogramming* ekspresi gen oleh faktor-faktor yang ada di sitoplasma, dan Go adalah fase siklus sel yang paling sesuai (Campbell, 1996; Campbell, 1999). Selain itu induksi sel donor menjadi fase G0/G1 juga dimaksudkan untuk mempertahankan ploidi yang benar dan untuk mencegah kerusakan DNA dari sel rekonstruksi melalui TN (Vacková, 2003; Campbell, 1999).

Sel donor yang dilakukan starvasi serum pada penelitian ini adalah subpasase 3, yang mempunyai ratio sel hidup 79,55 dan setelah dilakukan starvasi serum sampai hari 3 ratio sel hidup masih stabil. Hari selanjutnya (hari 5), ratio sel hidup menurun secara drastis yang berarti ratio kematian sel meningkat. Kematian sel ada 2 tipe. Tipe I atau biasa disebut apoptosis, ditandai dengan kondensasi kromatin menjadi satu massa, sementara sitoplasma masih tampak utuh, namun lama kelamaan juga kondensasi. Perubahan nukleus merupakan proses yang pertama kali nampak. Pemeriksaan elektroforesis DNA terhadap kromatin yang kondensasi menunjukkan adanya fragmentasi. Kematian sel tipe II dimulai dengan peningkatan lisosom, timbulnya erosi pada endoplasmik retikullum dan penurunan sintesa protein. Kondensasi nukleus terjadi lebih lambat. Pemeriksaan mikroskop pembesaran kecil pada stadium awal, nukleus masih nampak relatif normal (Holbrook *et al*., 1996).

Pemeriksaan untuk mengetahui sel hidup atau mati (nekrosis) adalah dengan menggunakan metode pewarnaan Hoechst-44432 yang dikombinasikan dengan *Propidium Iodide* (H-33342-PI). Pewarnaan H-33342 menunjukkan adanya nukleus. Pewarnaan PI menunjukkan kematian sel. Prinsipnya, sel nekrosis yang telah kehilangan integritas membran akan terwarnai merah oleh PI dan sel hidup tidak terwarnai (Anonymus, 2005).

Banyak signal yang dapat menyebabkan apoptosis, sebagai contoh over stimulasi dari reseptor sel T, terapi dengan glukokortikoid, virus dan radiasi. Pada *in vitro*, menghilangkan (withdrawal) hormon pertumbuhan atau gangguan reseptor hormon pertumbuhan dapat menyebabkan apoptosis (Lockshin dan Zakeri, 1996 *in* Holbrook *et al.,* 1996). Dengan demikian, banyaknya apoptosis dalam starvasi serum ini bukan disebabkan oleh proses penuaan sel atau pemendekan telomer, tetapi disebabkan sedikitnya hormon pertumbuhan akibat starvasi serum.

Mekanisme terjadinya apoptosis *in vitro* pada kultur sel donor starvasi serum, masih belum jelas apakah lewat jalur ekstrinsik melalui caspase 8 dan 10 atau lewat jalur intrinsik melalui caspase 9 dan 2. Jalur ekstrinsik biasanya terjadi karena kelainan sel selama pertumbuhan, pada pendidikan sistim imun dan pembuangan tumor yang dimediasi sistim imun. Jalur intrinsik biasanya sebagai respon terhadap radiasi ionisasi, obat-obatan kemoterapi dan kerusakan mitokondria.(Boatright dan Salvesen, 2003).

Pemeriksaan apoptosis dini pada penelitian ini adalah untuk mendeteksi aktivitas caspase 3, yang merupakan caspase eksekusioner bersama dari caspase inisiator apoptosis jalur ekstrinsik maupun jalur intrinsik. Apoptosis melalui jalur ekstrinsik dipicu oleh ligasi dari Fas (juga dikenal sebagai CD95 atau APO-1) yaitu suatu *trans-membrane death receptor* dari superfamili *tumor necrosis factor receptor* tipe1. Sedangkan pada jalur intrinsik, adanya triger kematian sel menyebabkan mitokondria menjadi permeabel secara selektif, menimbulkan pelepasan sitokrom c dan mengaktifkan caspase 9 didalam bentukan yang disebut *apoptosome*. Selanjutnya caspase 9 aktif, sama dengan caspase 8 aktif mengaktifkan procaspase 3 menjadi caspase 3 aktif yang bertindak sebagai caspase eksekutioner untuk menimbulkan apoptosis.

Starvasi serum untuk menginduksi sel fase G0/G1 yang dipakai dalam penelitian ini adalah starvasi hari 3. Menurut penelitian Yu *et al.,* (2003) starvasi serum hari 3 sel fase G0/G1 sebanyak 70,2 %, dan hari 5 sebanyak 83,4 %, (Yu *et al., cit.* Das *et al.,* 2003). Meskipun starvasi hari 5 dapat menghasilkan sel fase G0/G1 lebih banyak, namun karena viabilitasnya menurun tajam dibanding hari 3, yang dipakai adalah starvasi serum hari 3.

Penelitian eksperimental laboratoris pengaruh karakteristik sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi

TNS yang memakai sitoplasma resipien memungkinkan terjadinya heteroplasmi mitokondria (dua sumber DNA mitokondria berbeda, satu dari sitoplasma resipien, satu dari sel donor) akibat ada tambahan (kontaminasi) mitokondria sel donor. Oosit mamalia berisi sekitar 105 mitokondria (Mollard *et al.*, 2002). Nukleus yang diinsersikan dalam TNS ini bukanlah nukleus fibroblas murni, tetapi fibroblas utuh dipilih yang berukuran ≤ 6 μm, diambil untuk diinsersikan ke sitoplasma resipien dengan cara diaspirasi menggunakan pipet injeksi ukuran diameter luar 8-10 μm. Pipet injeksi dengan diameter luar 8-10 μm berarti mempunyai lubang sekitar 4-5 μm. Fibroblas yang berukuran 6μm bila dimasukkan lubang pipet injeksi ukuran 5μm akan merusak dinding selnya. Dengan demikian, nukleus donor yang dimasukkan kedalam sitoplasma resipien akan terikut didalamnya sitoplasma fibroblas yang mengandung mitokondria. Adanya heteroplasmi mitokondria, menurut Wolf *et al.,* (2001) merupakan potensi timbulnya masalah, namun dari data yang ada belum dapat disimpulkan secara definitif masalah yang ditimbulkan. Sedangkan menurut Mollard *et al.,* (2002) mitokondria sel donor yang ikut masuk sitooplasma resipien pada TNS secara aktif akan dieliminasi dengan mekanisme yang sama dengan eliminasi mitokondria paternal pada reproduksi seksual. Pada fertilisasi dalam reproduksi seksual, sejumlah mitokondria paternal ikut masuk kedalam oosit. Mitokondria

yang berasal dari paternal selanjutnya dieliminasi dari zigot pada beberapa pembelahan awal sel dengan mekanisme yang belum jelas sehingga menghasilkan homoplasti mitokondria maternal (Kaneda *et al.*, 1995 *cit.* Mollard *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 1999 *cit.* Mollard *et al.*, 2002).

Pada apoptosis melalui jalur intrinsik, dimulai dengan kerusakan mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom c (Boatright dan Salvesen, 2003) Dengan demikian, mitokondria sel donor A yang mempunyai ratio sel hidup lebih tinggi atau apoptosis lebih rendah, diperkirakan mempunyai mitokondria normal lebih banyak dibanding sel donor B yang mempunyai ratio sel hidup lebih rendah atau apoptosis lebih tinggi. Perlu penelitian lebih lanjut apakah heteroplasmi dengan mitokondria yang banyak terjadi kerusakan dapat meningkatkan perkembangan sel rekonstruksi pada stadium awal (4-8 sel) dan menurunkan perkembangan sel rekonstruksi pada stadium lebih lanjut (morula). Penelitian lanjutan tersebut diharapkan juga dapat menjawab pertanyaan, faktor sel donor yang mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi terletak dimana, pada faktor di sitoplasma, di nukleus atau kombinasi keduanya.

Perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS menggunakan sel donor A berbeda secara bermakna dengan sel donor B. Disisi lain, hasil penelitian Jones *et al.*, (2001) perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS bergantung pada metilasi DNA. Menurut Mollard *et al* (2002) metilasi DNA berperanan didalam modifikasi epigenetic imprint. Sel sel dalam tubuh mamalia mempunyai isi DNA yang sama sehingga informasi genetiknya sama, tetapi mempunyai diversitas fungsi yang luas. Hal ini disebabkan modifikasi epigenetic imprint melalui metilasi. Penelitian Jones *et al.*, (2001) tentang metilasi DNA sel donor setelah TN, dari analisa regresi antara perkembangan sel rekonstruksi dan DNA metilasi sel donor menunjukkan bahwa jika DNA metilasi sel donor berkurang maka

perkembangan sel rekonstruksi meningkat, namun demikian diperlukan lebih banyak penelitian apakah hal ini berbeda secara bermakna. Lebih jauh dinyatalan bahwa analisis metilasi sel donor memungkinkan untuk digunakan sebagai prediksi kemampuan perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS. Apabila viabilitas sel donor mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dan metilasi DNA juga mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS, diperkirakan viabilitas sel donor akan mempengaruhi metilasi DNA.

Potensi timbulnya masalah lain dari sel rekonstruksi hasil TNS adalah panjang telomer (Wolf *et al.*, 2001). Prosedur TNS adalah memakai sel dewasa atau sel yang telah beberapa kali pembelahan sel sebagai donor nukleus. Sebelum dipakai sebagai sumber nukleus donor, perlu dikultur beberapa kali, sehingga perlu dipertanyakan apakah jam mitosis dapat di reset sehingga sel rekonstruksi hasil TNS tidak menunjukkan percepatan umur menjadi penuaan dini (Mollard *et al*., 2002). Panjang telomer berkaitan dengan jumlah pembelahan sel. Sel donor A adalah sel donor subpasase 3 (tidak dilakukan starvasi serum). Sel donor B adalah sel donor subpasase 3 yang telah dilakukan starvasi serum. Pada penelitian ini, diduga panjang telomer awal dari sel donor tidak berperan dalam perbedaan perkembangan sel rekonstruksi karena diperkirakan panjang telomer sel donor A sama dengan sel donor B. Panjang telomer suatu sel rekonstruksi atau zygote hasil fertilisasi normal dapat terjadi restorasi. Telomer dipelihara oleh telomerase. Fungsi dari telomerase adalah mensintesa ulangan 50-TTAGGG-30 pada ujung telomer sehingga memulihkan kembali panjang telomere (Ku¨hholzer-Cabot, 2002). Aktivitas telomerase sel rekonstruksi mulai nampak pada stadium morula (Mollard *et al*., 2002). Pengaruh akibat adanya perubahan panjang telomer selama perkembangan sel rekonstruksi pada penelitian ini diduga tidak terjadi karena pertumbuhan hanya sampai stadium morula, tidak ada yang mencapai stadium blastosis.

Sel rekonstruksi yang dihasilkan dalam penelitian ini termasuk kelompok *stem cell* yang totipoten. Sel rekonstruksi dikelompokkan *stem cell* bila mempunyai kemampuan tak terbatas untuk membelah dalam kultur dan mempunyai potensi menjadi sel khusus yang dewasa (*mature specialized cell type*). Sel rekonstruksi juga dikelompokkan sebagai sel totipoten bila mampu untuk membentuk semua jenis sel dari hasil konsepsi, meliputi keseluruhan fetus dan plasenta. Sel totipoten mempunyai kemampuan tak terbatas, mampu membentuk organisme utuh. Hasil jangka panjang penelitian ini diharapkan dapat untuk memproduksi sel sebagai *graft* untuk keperluan terapi *stem cell* yang bersifat pluripoten. Pluripotensi berarti kemampuan untuk membentuk beberapa tipe sel dari ketiga lapisan germinativum (ektoderm, mesoderm dan endoderm), tetapi tidak dapat membentuk organisme utuh. *Stem cell* yang sudah ada dalam tubuh merupakan *stem cell* yang multipoten dan mempunyai keterbatasan untuk digunakan sebagai bahan terapi *stem cell* seperti telah disebutkan dalam pendahuluan. *Stem cell* jaringan dikelompokkan sebagai *stem cell* yang multipoten karena mempunyai kemampuan hanya terbatas menjasi sel dan jaringan yang sesuai dengan lokasinya, misalnya *stem cell* darah menjadi sel darah merah, lekosit dan trombosit (Bongso dan Richards, 2004).

Keberhasilan terjadinya pembelahan sel rekonstruksi sangat bervariasi. Penelitian Das *et al.,* (2003), TNS menggunakan sel donor starvasi serum ada 3 dari 87 sel rekonstruksi (3,4%) terjadi pembelahan sel. Pada serum standard (growing cell) 7 dari 158 sel (4,4%) terjadi pembelahan sel. Tao (1999) penggunaan sel donor dengan starvasi serum ada 15 dari 45 sel rekonstruksi (33,3,0%) terjadi pembelahan sel dan pada serum standard (growing cell) 15 dari 50 sel (30,0%) terjadi pembelahan sel.Pada penelitian ini dari 125 sel rekonstruksi menggunakan sel donor hasil kultur standard ada 19 (15,2%) terjadi

pembelahan sel dan dari 118 sel donor hasil starvasi serum ada 15 (12,7%) terjadi pembelahan sel.

Kultur terhadap sel rekonstruksi hasil TNS teknik IDNI dalam medium dasar TCM199, belum mampu menghasilkan sel yang mencapai blastosis. Penyebab rendahnya tingkat perkembangan sel rekonstruksi dapat disebabkan karena kelainan ekspresi gene yang terjadi selama kultur *in vitro* (Kobayashi *et al.*, 2004). Namun menurut Campbell (1999) faktor metoda kultur juga sangat mempengaruhi tingkat perkembanagn. Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian lanjutan, bagaimana metode kultur sel rekonstruksi yang paling optimal, untuk memproduksi blastosis dan mengeksplorasi hubungannya dengan viabilitas sel donor.

Pada kelompok sel donor dengan sistim kultur starvasi serum meskipun tingkat pertumbuhannya hanya mencapai tahap 4-8 sel, namun bila dilihat tingkat pembelahannya lebih tinggi. Dari 125 sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor starvasi serum ada 19 (15,2%) yang terjadi pembelahan. Sedangkan sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor kultur standard dari 118 ada 15 (12,7%) yang terjadi pembelahan. Padahal sel donor starvasi serum mempunyai ratio apoptosis yang lebih tinggi dibanding sel donor hasil kultur standard. Sebaliknya sel donor starvasi serum mempunyai ratio sel hidup yang lebih rendah dibanding sel donor hasil kultur standard. Hal ini berarti bahwa tingkat kerusakan sitoplasma sel donor starvasi serum lebih tinggi dibanding sel donor hasil kultur standard. Hasil sebaliknya terjadi pada stadium lebih lanjut (morula). Dari 125 sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor starvasi serum ada 3 (0,8%) yang mencapai morula. Sedangkan sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor kultur standard dari 118 ada 7 (5,93%) yang mencapai 4-8 sel tidak ada yang mencapai morula. Berdasar hal tersebut dapat

disimpulkan faktor sitoplasma sel donor berperan didalam perkembangan sel rekonstruksi.

Faktor apa dari sitoplasma yang mempengaruhi proses *reprogramming* sel rekonstruksi masih belum jelas (Hansis *et al.,* 2004). Apabila perkembangan sel rekonstruksi menggambarkan *reprogramming* sel rekonstruksi (Fulka *et al.,* 2001), sitoplasma sel donor mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi, dan fase siklus sel G0/G1 meningkatkan keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi maka tingkat perkembangan sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor starvasi serum (telah diinduksi menjadi fase G0/G1 dan mempunyai ratio apoptosis lebih tinggi) yang lebih tinggi bukan karena ratio apoptosis / kerusakan sitoplasma yang lebih tinggi, tetapi karena faktor fase siklus sel (G0/G1). Nukleus diploid (G0 dan G1) sel rekonstruksi yang mengalami perkembangan, akan kondensasi untuk membentuk kromatid tunggal dan menjaga ploidi yang benar, setelah terjadi sekian kali replikasi DNA (Collas dan Robl, 1991). Proses PCC akan menyebabkan kerusakan DNA inti bila terjadi saat sel pada fase S (S-phase) dan sebaliknya tidak berpengaruh bila terjadi saat sel pada fase G0, G1 atau G2 (Schwartz, 1971; Collas, 1992). Degradasi DNA sel donor mungkin merupakan salah satu faktor yang menyebabkan ketidaknormalan perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS (Peura, 2001). Berdasar data tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa (1). Normalitas sitoplasma sel donor meningkatkan tingkat pertumbuhan sel rekonstruksi pada stadium lanjut (morula). (2). Regulasi perkembangan sel rekonstruksi stadium awal tidak pada tingkat sitoplasma, tetapi pada tingkat nukleus.

Kultur sel donor yang panjang tidak berpengaruh terhadap kemampuan perkembangan sel rekosntruksi, namun bisa menyebabkan terjadinya kenaikan apoptosis blastomer (Jang *et al.,* 2004). Persentase jumlah sel hidup, apoptosis

dini dan apoptosis lanjut dari sel donor secara nyata mempengaruhi pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TNS. Dengan demikian dapat diperkirakan bahwa meningkatnya kejadian apoptosis blastomer pada kultur sel donor jangka lama tersebut berkaitan dengan banyaknya apoptosis dari sel donor itu sendiri. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, hubungan apoptosis sel donor dengan tingkat apoptosis dari blastomer.

Aplikasi hasil penelitian untuk terapi *stem cell* dimasa mendatang

Pembahasan berikut ini tidak ada kaitan langsung dengan penelitian yang telah dikerjakan, tetapi berkaitan dengan penelitian lanjutan untuk mencapai tujuan jangka panjang dari penelitian ini.

Konsep terapi *stem cell* dapat merubah teori lama tentang differensiasi sel, khususnya teori adanya jaringan dengan sel yang permanen yang telah terdifferensiasi dan tidak dapat untuk diperbaiki. Menurut Albert *et al.,* (1994), populasi dari sel-sel dalam tubuh tidak semuanya mengalami pergantian sel (*turn over*). Beberapa jenis sel, yang telah dibuat dalam jumlah yang cukup selama masa embrio, akan tetap bertahan selama dewasa, tidak mengalami pembelahan dan tidak dapat diganti jika mengalami kerusakan. Dalam hal ini, semua jenis sel saraf adalah permanen. Juga beberapa jenis sel dari mamalia seperti sel otot jantung, sel-sel pendengaran (auditory hair cells) dan sel lensa mata juga permanen. Tetapi, semua jenis sel tersebut mempunyai rentang kehidupan yang sangat panjang dan hidup dalam lingkungan yang terlindungi, serta masih sulit untuk dijelaskan generalisasi alasannya mengapa sel-sel tersebut permanen dan tidak dapat diganti. Untuk sel jantung dan sel pendengaran, masih sulit memberikan alasannya. Sedangkan dalam hal sel saraf, tampaknya pergantian pada masa dewasa akan merugikan karena sulitnya pemulihan pola koneksi saraf yang tepat dan kompleks yang telah dibentuk pada

kondisi yang sangat berbeda selama pertumbuhan. Lebih jauh, berbagai memori yang terekam dalam bentuk modifikasi struktur dalam bentuk interkoneksi antara sel-sel saraf akan hilang. Disisi lain, lensa mata merupakan sel yang permanen hanya karena konsekuensi cara tumbuhnya jaringan yang tidak dapat dihindari (Albert *et al.,* 1994).

Mekanisme penyembuhan pada terapi *stem cell* tidak hanya dengan cara penggantian sel yang telah mengalami kerusakan. Apabila mekanisme penyembuhan terapi *stem cell* hanya dengan penggantian sel yang rusak, maka alasan perlunya sel permanen dapat dibenarkan. Namun mekanisme penyembuhan terapi *stem cell*, selain dengan penggantian sel, juga dapat dengan fusi sel atau katalisa sel. Penyembuhan dengan mekanisme fusi sel, maka *stem cell* akan berfusi menjadi satu dengan sel yang diperbaiki sehinggan perubahan struktur dan interkoneksi dari sel yang lama dapat dihindari. Dengan demikian, efek yang merugikan seperti tersebut pada penggantian sel saraf dapat dicegah. Mekanisme penyembuhan terapi *stem cell* juga dapat dengan katalisa sel, yaitu *stem cell* mensekresi sitokin-sitokin yang diperlukan untuk reparasi sel yang rusak.

Penyediaan *stem cell* sebagai *graft* untuk terapi penggantian sel dengan metode TNS, memerlukan penyediaan oosit sebagai sitoplasma resipien. Selama ini, pengambilan oosit dari pasien masih ada masalah yaitu memerlukan biaya relatif tinggi dan cara pengambilannya masih tergolong invasif. Permasalahan ini bisa diminimalisir apabila penyediaan oosit bisa diperoleh dari kultur *stem cell*. Hübner *et al.,* (2003) telah berhasil mengkultur SE mencit menjadi oogonia yang dapat memasuki meiosis, merekrut sel sekitarnya membentuk struktur seperti folikel. Apabila pembentukan oosit (oogenesis) dapat dilakukan melalui kultur, diharapkan dapat memberikan kontribusi pada berbagai bidang, antara lain

interaksi sel somatik dan sel germinativum, differensiasi, TN dan pengembangan terapi infertilitas.

Masalah lain yang perlu diperhatikan untuk mencapai tujuan jangka panjang penelitian ini adalah bagaimana sistim untuk mengarahkan differensiasi SE menjadi lineage spesifik *in vitro* yang diperlukan untuk penetapan jenis sel tertentu untuk terapi penggantian sel (Conley *et al.,* 2004). Potensi SE untuk digunakan sebagai sumber sel yang tak terbatas untuk transplantasi sel adalah tergantung pada ketersediaan dan kemurnian sel dan kemampuan mengarahkan differensiasi menjadi sel spesifik *in vitro* (Eiges dan Benvenisty, 2002). Penulis lain juga berpendapat sama. Tantangan pengembangan dibidang klinis adalah bagaimana memproduksi dan memperbanyak tipe sel spesifik yang murni (tidak tercampur jenis sel yang lain) dari kultur kompleks yang berisi berbagai jenis sel. Kultur SE tanpa adanya inhibitor differensiasi, misalnya faktor inhibitor leukemia, akan menghasilkan bentukan yang disebut EB. EB adalah struktur multiseluler yang secara spontan berdifferensiasi menjadi sel sel ektoderm, endoderm, dan mesoderm. Meskipun kemungkinan untuk menjadi sel tertentu akan meningkat dengan pemberian faktor pertumbuhan yang cukup, derajad kemurnian sel secara umum belum memadai untuk diaplikasikan dalam klinis. Yang sangat penting adalah semua pluripoten sel harus dihilangkan dalam kultur sebelum dipakai dalam klinik. Bila tidak, potensi terjadinya teratoma adalah tinggi. Ada kontaminasi satu sel *undifferentiated* saja dapat terjadi pembentukan tumor (Strom *et al.,* 2001; Perpich, 2004; Reubinoff, 2004; Conley *et al.,* 2004)

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN UMUM

Kesimpulan dan saran umum dari penelitian ini adalah

1. Pemilihan sumber nukleus donor dalam TNS dari suatu subpasase atau starvasi serum, adalah dengan menggunakan sel donor yang dalam tahapan apoptosis awal. Hal ini mengindikasikan masih adanya kecukupan program-program DNA untuk terjadinya reprogramming. Namun demikian masih harus dikonfirmasi apakah regulasi hanya semata-mata dilakukan pada tingkat nukleus atau juga ada faktor yang terdapat dalam sitoplasma.
2. Perlu diperhatikan bahwa subpasase yang lebih banyak cenderung menurunkan jumlah sel hidup dan meningkatkan jumlah sel abnormal. Untuk tujuan teknis, perlu dikaji lebih lanjut jumlah subpasase ideal yang dipakai sebagai pedoman standard.
3. Sel donor dengan ukuran kecil (kurang atau sama dengan 6 μm) menghasilkan tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi dibanding dengan sel donor starvasi. Namun perlu dilihat lebih jauh, mengapa hal ini terjadi.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR PUSTAKA

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1994): Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing Inc. 3rd ed.

Anonymus, (2005). Measuring Apoptosis and Necrosis by dual laser flow cytometry. //cyto.mednet.ucla.edu/protocols/simulta,html.1-5

Anonymus : The Complete Apoptag Manual. Intergen Company.

Atabay E.C., Martinez-Diaz M.A., Dochi O. and Takahashi Y. (2001). Factors affecting Enucleation Rates of Bovine and Poecine Oocytes After Removal of Cumulus Cells by Vortexing.J.Reprod and Dev 47:365-371.

Boatright K.M.and Salvesen G.S. (2003): Mechanisms of caspase activation. Current Opinion in Cell Biology, 15:725–731

Barry F.P., Murphy J.M. (2004): Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36 568–584

Bongso A., Richards M. (2004) : History and perspective of stem cell research. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Vol. 18, No. 6, pp. 827–842.

Brian M. Strem B.M., Hedrick M.H. (2005): The growing importance of fat in regenerative medicine. TRENDS in Biotechnology Vol.23 No.2 February

Campbell K.H.S. (1999): Nuclear transfer in farm animal species. seminars in CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Vol 10, pp. 245]252

Campbell, KHS., Mc. Whir, J. Richie, W.A. Wilmut, I, (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 380: 64 – 66.

Cho J.K., Lee B.C., Park J.I. Lim J.M., Shin S.J. Kim K.J., Lee B.D., Hwang W.S.(2002): Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. Theriogenology. 1819-1828

Choi Y.H., Love C.C., Chung Y.G., Varner D.D., Westhusin M.E., Burgardt R.C., and Hinrichs K.(2002): Production of Nuclear Transfer Horse Embryos by Piezo-Driven Injection of Somatic Cell Nuclei and Activation with Stallion Sperm Cytosolic Extract. Biology of Reproduction 67, 561-567.

Colman A. (2004): Making new beta cells from stem cells. Seminars in Cell & Developmental Biology 15.337–345.

Conley B.J., Young J.C., Trounson A.O., Mollard R. (2004): Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36 555–567.

Conrad C., and Huss R. (2005), : Adult Stem Cell Lines in Regenerative Medicine and Reconstructive Surgery. Journal of Surgical Research xx, xxx Article in press.

Das S.K., Majumdar A.C. Taru Sharma G. (2003): In vitro development of reconstructed goat oocytes after somatic cell nuclear transfer with fetal fibroblast cells. Small Ruminant Research 48.217–225

Dean W., Santos F., Reik W. (2003): Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. Seminars in Cell & Developmental Biology 14.93–100

Deong-Bon Koo, Kang Y.K., Choi Y.H., Park J.S., Kim H., Kim T., Lee K.K., Han Y.M. (2001) : Development Potential and Transgene expression of Porcine Nuclear Transfer Embryo using Somatic Cell. J of Molecular Reproduction and Development. 58 : 15-21..

Eiges R., Benvenisty N. (2002): A molecular view on pluripotent stem cells. FEBS Letters 529.135-141.

Fairchild P.J., Nolan K.F., Cartland S., Waldmann H. (2005): Embryonic stem cells: a novel source of dendritic cells for clinical applications. International Immunopharmacology 5.13–21

Fraser J.K., Schreiber R.E., Zuk P.A., Hedrick M.H. (2004): Adult stem cell therapy for the heart. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36.658–666

Fuchs E., Tumbar T., and Guasch G. (2004): Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. Cell, Vol. 116, 769–778, March 19.

Fulka, J. Jr., Loi P., Ledda S., Moor R.M. and Fulka J. (2001): Nucleus transfer in mammals: How the oocyte cytoplasm modifies the transferred nucleus. Theriogenology 55:1373-1380.

Han Y.M., Kang Y.K., Koo D.B., Lee K.K. (2003): Nuclear Reprogrammning of cloned embryos produced in vitro. Theriogenology 59.33-44.

Hansis C., Barreto G., Maltry N, and Niehrs C. (2004): Nuclear Reprogramming of Human Somatic Cells by Xenopus Egg Extract Requires BRG1. Current Biology, Vol. 14, 1475–1480.

Henningson C.T., Jr, Stanislaus M.A., and Gewirtz A.M. (2003): Embryonic and adult stem cell therapy. J ALLERGY CLIN IMMUNOL

Holbrook N.J., Martin G.R., Lockshin R.A.(1996): Cellular Aging and Cell death. Wiley-Liss.Inc.

Hozumi T., (2001) Reproductive Biology and Biotechnology. Japan International Cooperation Agency Indonesia.

Hũbner K., Fuchrmann G., Christenson L.K., Kehler J., Reinbold R., Fuente R.D.L., Wood J., Strause II J.S., Boiani M., and Schöler H.R. (2003): Derivation of oocytes from Mouse Embryonic Stem Cell. Science Vol 300.

Humes H.D., Szczypka M.S. (2004): Advances in cell therapy for renal failure Transplant Immunology 12 .219–227

Jang,,G., E.S Park, J.K Cho., M.M.U Bhuiyan, B.C.Lee,S.K Kang, and W.S. Hwang. (2004): Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in somatic cell nuclear transfer embryo reconstructed with long-term cultured donor cells. Theriogenology xxx.xxx-xxx. www.sciencedirect.com. Article in press.

Jones K.L., T. Shin and L. Liu. (2001): Analysis of donor cell DNA methylation as predictor of blastocyts development after nuclear transplantation. Proceeding of the Animal conference International Embryo Transfer Society. Omaka, Nebraska, USA, 13- 16 .Abstract : Theriogenology: 272.

Jouneau A and Renardy J.P. (2003): Reprogramming in nuclear transfer. Current Opinion in Genetics & Development. 13:486–491.

Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H. and Tsunoda Y.(1998) : Eight calves derived from somatic cells of a single adult. Science 282: 2095-2098.

Kato, Y and Tsunoda Y. (1992): Sycchronous division of mouse two-cell embryos with nocodazole in vitro. J. Repeod, Fert. 95 : 39 – 43.

Keefer , C.L., Baldasarre H., Kayston R., Wang B., Bathia B., Bilodeau A.S.,, Zhou J.F., Leduc M., Downwy B.R.,, Lazaris A. and Karatzas C.N.. (2001): Generation of Dwarf Goat (Capra hircus) Clones Following Nuclear Transfer with Transfected and NonTransfected Fetal Fibroblast and In Vitro-Matured Oocutes. J. of Biology of Reproduction 64, 849 – 856.

Kishi M., Itagaki Y, Takakura R., Imamura M., Sudo, T. Yoshinari M, Tanimoto M., Yasue M., Kashima N. (2000): Nuclear Transfer in Cattle using colostrum-derived mammary Gland Ephithelial cells and Erat-Derived Fibroblast cells. J. theriogenology 54(5): 675 – 684.

Koh C. J., Anthony Atala A. (2004): Therapeutic cloning applications for organ transplantation Transplant. Immunology 12.193–201

Kono T., Sotomaru Y., Aono F., Takahashi T., Ogiwara I., Sekizawa F., Arai T., Nakahara T. (1994): Effect of ooplast activation on the development of the oocytes following nuclear transfer in cattle. J. Theriogenology 4`1: 1463-1471

Kühholzer-Cabot B, Brem G. (2002): Mini-Review Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer. Experimental Gerontology 37.1315–1321

Lerou P.H., Daley G.Q. (2005): Therapeutic potential of embryonic stem cells. Blood Reviews.xxx, xxx–xxx. Article In Press.

Liu J.L., Wang M.K., Shun Q.Y., Chen D.Y. (2000) : Effect of telophase enucleation on Bovine Somatic Nuclear Transfer. J Theriogenology Vol. 54 :984-998.

Martin B.M., (1994): Tissue Culture Techniques. An Introduction. Birkhauser Boston.

Mollard R., Denham M., Trounson A. (2002): Technical advances and Pitfalls on the way to human cloning. Differentiation. 70:1-9

Nakano T. (2003): Hematopoietic stem cells: generation and manipulation. TRENDS in Immunology Vol.24 No.11.

Nour M. M.S; Ikeda K; Takahashi Y (2000): Bovine nuclear transfer using cumulus cells derived from serum –starved and confluent cultures. J.Reprod.Dev. 46: 85-92.

Okamoto R. and Watanabe M. (2003): Prospects for regeneration of gastrointestinal epithelia using bone-marrow cells. TRENDS in Molecular Medicine Vol.9 No.7.

Ongeri E.M., Bormann C.L., Butler R.E., Melican D., Gavin W.G., Echelard Y., Krisher R.L. and Bedboodi E. (2001): Development of goat embryo after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different method. J. Theriogenology Vol. 55 (9): 1933-45.

Perpich J.G. (2004): The dawn of genomic and regenerative medicine:new paradigms for medicine, the public's health, and society. Technology in Society 26. 405–414

Peura, T.T (2001): Serum strarvation can cause excessive DNA damage in sheep fetal fibroblasts. Proceeding of the Animal conference International Embryo Transfer Society. Omaka, Nebraska, USA, 13- 16. Abstract : Theriogenology 258.

Reggio B.C., (2002): Production of Transgenic Goat by Somatic Cell Nuclear Transfer. Dissertation. Department of Animal Science, Lousiana State University, USA. 8-25.

Reubinoff B. (2004): Human embryonic stem cells—potential applications for regenerative medicine. International Congress Series 1266.45– 53

Robl J.M. and Stice S.L. (1989): Prospects for the commercial Cloning on Animals by nuclear transplantation. J. Theriogenology. 31:75-84.

Rodriguez A.M., Elabd C., Amri E.Z., Ailhaud G., Dani C. (2005): The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Biochimie 87.125–128

Rubin H. (1997): Cell aging in vivo and in vitro. Mechanisms of Ageing and Development 98 1–35

Shiga K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y. and Nagai T. (1999). Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from JapaneseBlack Bull. J. Theriogenology. 52:527-535.

Speroff L and Fritz M.A. (2005): Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Strom T.B., Field L.J., and Ruediger M. (2001): Allogeneic Stem Cells, Clinical Transplantation, and the Origins of Regenerative Medicine. Transplantation Proceedings, 33, 3044–3049.

Sutovsky P and Prather R.S. (2004): Nuclear remodeling after SCNT: a contractor's nightmare. TRENDS in Biotechnology Vol.22 No.5.

Tada M. (1998):: Epigenetic Reprogramming. Embo J. 16, 6510-6520

Tao T., Machaty Z., Boquest A.C., Day B.N., Prather R.S.(1999): Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into in vitro matured oocytes. Animal Reproduction Science 56 133–141

Tsai R.Y.L. (2004): A molecular view of stem cell and cancer cell self-renewal. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36 684–694

Tsukada N; Kudoch K; Budiman M; Yamamoto A; Higuchi T; Kobayashi M; Sato K; Oishi K and Lida K. (2003): Development of Automated Nuclear Transplantation system. J.Mamm.Ova.Res.Vol.18,106-109.

Urakawa M., Ideta A., Sawada T., Aoyagi Y. (2004): Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells. Theriogenology 62. 714–728

Vacková I., Engelová M., Marinov I., Tománek M. (2003): Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine. Animal Reproduction Science 77. 235–245

Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R. Yanagimachi R. (1998): Fulterm development of mice from enucleated oocytesinjected with cumulus cells nuclei. Nature 394: 369-374.

Wakayama, T., Rondriguez I., Perry A.C.F., Yanagimachi R., Mombaerts P. (1999): Mice Cloned from Embryonic Stem Cells. Proc. Nat Acad. Sci. USA 96: 14984-14989 .

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

Wakayama,T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R.. (1998): Fullterm development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cells nuclei. Nature 394: 369-374.

Wells, D.N., Misica P.M., Tervit H.R.. (1999): Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adulst mural granulosa cells. J. Biol. Reprod 60 : 996 – 1005.

Wells, D.N, Misica P.M., Day A.M., Peterson A.J., Tervit. H.R. (1998): Cloning sheep from cultured embryonic cells. J. reprod Fertil Dev. 10: 615 – 626.

Wilmut I; Schnieke AE; McWhir J; Kind AJ & Camphell K.H.S (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385 : 810 – 813

Wobus A.M. (2001): Potential of embryonic stem cells. Molecular Aspects of Medicine 22. 149-164.

Wolf D.P., Mitalipov S.and Robert B. Norgren, Jr. (2001): Nuclear Transfer Technology in Mammalian Cloning. Archives of Medical Research 32 . 609–613

Yanagimachi, R. (2002): Cloning; experience from the mouse and other animals. Molecular and Cellular Endocrinology 187: 241 – 248.

Yang X., Jiang S., Kovacs A., Foote R.H., (1992): Nuclear totipotency of cultured rabbit morula to support full-term development following nuclear transfer. J.Biol.Reprod 47:636-43.

Yang X., Tian X.C. (2000): Cloning Adult Animals- What is the Genetic Age of the Clones? Cloning. Vol 2, No 3.

Yu Y.S., Sun X.S., Jiang H.N., Han Y., Zhao C.B., Tan J.H. (2003): Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblast in goats : work in progress. Theriogenology 59. 1277-1289.

Zakharchenko V., Stojkovic M., Brem G., Wolf E., (1997). Karyoplast-cytoplast volume ratio in Bovine Nuclear Transfer Embryos: Effect on Developmental Potensial. Mol. Reprod Dev, 48: 332-38.

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID