

Tingkat Pertumbuhan dan Analisa Protein Sel-Sel Fibroblas Fetal Tikus Hasil Kultur *In Vitro*

In Vitro Growth and Protein Analysis of Rat Fetal Fibroblast Cells

I. Djuwita*¹⁾, Harlystiarini²⁾, T. Widyaputri²⁾, A. Efendi²⁾, E.M Kaiin¹⁾,
dan Nurhidayat¹⁾

Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan¹⁾, Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan²⁾, Mahasiswa Sekolah Pascasarjana³⁾ Institut Pertanian Bogor

Abstract

Research has been conducted on *in vitro* growth of rat fetal fibroblast cells in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 50 µg/ml gentamycin. Culture was done in 5% CO₂ incubator at 37°C for 10 days. Evaluation was done on the proliferation rate and the protein production after several passages. The growth of the fibroblast was confirmed by their morphology. The proliferation rate was done based on the population doubling time (PDT) by counting the number of cells in each passage by using Improved Neubauer hemocytometer. Protein secreted into the culture medium without FBS, designed as conditioned medium of rat fetal fibroblast (CM-RFF) was analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and biological assay on its potency to inhibit differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). Quantitative data were analyzed using statistical T-test on Minitab program. The results showed that based on the population doubling time, the proliferation rate was increased in line with the number of passages and based on the SDS-PAGE analysis, the fibroblast cells secreted several protein included in estimation a 34 kDa protein that can be maintained until 9 passages. Addition of 25% CM-RFF into mDMEM (without FBS) did not increase the percentage of bone marrow mesenchymal stem cells-like, but significantly increased the percentage of fibroblast. The presence of LIF in the medium significantly increased the percentage of BMSCs-like and fibroblast. It can be concluded that the growth and protein secretion of rat fetal fibroblast cells can be maintain until 9 passages; but the secreted protein could not increased the percentage of the bone marrow mesenchymal stem cells like.

Keywords: fibroblast, proliferation, protein, bone marrow, mesenchymal stem cells

Pendahuluan

Sel fibroblas merupakan sel yang paling umum ditemui pada jaringan ikat dan mensintesis beberapa komponen matriks ekstraseluler (kolagen, retikuler, elastin), beberapa makromolekul anionik (glikosaminoglikans, proteoglikans) serta glikoprotein multiadesif (laminin dan fibronectin) yang dapat mendorong perlekatan sel pada substrat. Disamping itu, sel fibroblast mensekresikan sitokin dan beberapa *growth factors*, diantaranya yang dapat menstimulasi proliferasi sel dan menghambat proses diferensiasi (Mallon *et al.* 2006).

Kultur *in vitro* sel-sel fibroblas dilaporkan mensekresikan sekitar 175 jenis protein, diantaranya adalah beberapa faktor yang mampu menghambat diferensiasi sel seperti *basic fibroblast growth factor* (bFGF/FGF2). Medium yang mengandung sekreta yang dihasilkan oleh sel-sel fibroblas dikenal dengan sebutan *conditioned medium* (CM). Sekreta FGF2 dapat digunakan untuk mempertahankan pluripotensi *embryonic stem cells* (ESC, sel punca embrionik) dan umumnya dimanfaatkan dalam bentuk *fibroblast feeder layer* atau *fibroblast conditioned medium* (F-CM) (Levenstein *et al.* 2006; Prowse *et al.* 2007; Rylova *et al.* 2008). *Mouse embryonic fibroblast* (MEF) merupakan

kultur sel fibroblas mencit yang sering digunakan sebagai *feeder layer* dalam penelitian yang berkaitan dengan ESC manusia karena kemampuannya menghasilkan beberapa faktor yang mampu menghambat diferensiasi sel (Greger *et al.* 2007; Rylova *et al.* 2008). Menurut Navsaria *et al.* (1994) MEF menghasilkan protein matriks ekstraseluler yang mendorong perlekatan sel, dan juga menghasilkan sitokin serta faktor pertumbuhan yang dapat menstimulasi proliferasi sel (Mallon *et al.* 2006). Untuk mencegah terjadinya diferensiasi MEF digunakan bersama-sama dengan *Leukemia Inhibitor Factor* (LIF).

Leukemia inhibitory factor adalah sejenis sitokin dari golongan Interleukin-6 (IL-6) yang menunjukkan aktivitas pleiotropik pada banyak jenis sel dan jaringan (Rose 2002; Hill & Vernallis 2008). Di dalam medium kultur, LIF dapat berfungsi sebagai pengganti *feeder layer* untuk pertumbuhan *embryonic stem cells* mencit karena kemampuan LIF yang dapat mempengaruhi berbagai aktivitas fisiologis termasuk menghambat diferensiasi dari ESC (Gendall *et al.* 1997; Williams *et al.* 1998; Matsuda *et al.* 1999). Penggunaan LIF 5-20 ng/ml dapat meningkatkan pertumbuhan koloni, menjaga proliferasi yang tinggi serta totipotensi pada *mouse R1 cell line embryonic stem cell* (Anonimus 2008).

Sumsum tulang (*bone marrow*) diketahui mengandung *mesenchymal stem cells* (sel punca mesenkimal) atau dikenal dengan istilah *mesenchymal stem cells (MSCs)*. Sel-sel tersebut memiliki sifat multipoten karena terbukti dapat diarahkan menjadi berbagai tipe sel tubuh seperti sel saraf, sel β pancreas dan osteosit (Stocum 2004); karenanya upaya untuk dapat mengisolasi dan proliferasi MSCs akan sangat bermanfaat untuk digunakan lebih lanjut dalam terapi sel. Terapi sel merupakan upaya pengobatan melalui pergantian atau regenerasi sel. Sussman (2001) menyatakan bahwa di dalam medium kultur, MSCs sumsum tulang mudah berdiferensiasi secara spontan menjadi berbagai jenis sel; karenanya untuk mendapatkan MSCs dalam jumlah banyak namun tetapi multipoten perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan proliferasi dan mencegah terjadinya diferensiasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan dan sekreta sel-sel fibroblas hasil kultur *in vitro* sampai 9 pasase, serta menganalisis kemampuan sekreta fibroblas dalam meningkatkan proliferasi dan atau menghambat proses diferensiasi *mesenchymal stem cells* sumsum tulang dengan dan tanpa *Leukemia Inhibitor Factor*.

Bahan dan Metode

Isolasi, Kultur In Vitro dan Pasase

Sel fibroblas diisolasi dari otot fetus tikus (*Sprague Dawley*) umur kebuntingan 14 hari. Setelah proses disosiasi menggunakan enzim tripsin 0.1% - EDTA 2mM dalam larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) yang diberi tambahan *fetal calf serum* (FCS, Gibco-BRL/Life Technologies) 10% dan gentamisin 50 μ g/ml (mPBS), sel dicuci berturut-turut dalam medium mPBS dan medium kultur *Dulbeccos' Modified Eagle Medium* yang dimodifikasi dengan penambahan asam amino non-esensial (AANE) 10%, FCS 10%, sodium bicarbonat 3 mM, 2-mercaptoetanol 0.1 mM dan gentamycine 50 μ g/ml (mDMEM) masing sebanyak 3 dan 2 kali ulangan. Sebelum dilakukan penanaman, konsentrasi sel dihitung menggunakan hemositometer *Neubauer*. Sebanyak 10^6 sel/ml otot fetus dikultur dalam cawan petri disposable yang mengandung 2 ml mDMEM. Inkubasi dilakukan dalam inkubator CO₂, suhu 37 °C sampai membentuk monolayer dengan 90% konfluen. Pasase dilakukan dengan mendisosiasi monolayer fibroblas menggunakan enzim tripsin 0,1% - EDTA 2mM dalam larutan mPBS tanpa FCS dan dilakukan sampai dengan pasase 9. Morfologi sel fibroblas diamati secara natif, jumlah sel dihitung pada setiap pasase menggunakan hemositometer *Improved Neubauer*, sedangkan kecepatan proliferasi sel dihitung berdasarkan *population doubling time* berdasarkan Mader (2000).

Pembuatan dan Analisa Conditioned-Medium Fibroblas Fetus Tikus (CM-RFF)

Kultur yang telah mencapai 90% konfluen dibuang mediumnya, kemudian dicuci dengan larutan mPBS (tanpa FCS), dan diganti dengan medium mDMEM (tanpa FCS). Setelah dikultur kembali selama 2 hari, medium dikoleksi

sebagai *CM-RFF* yang kemudian dianalisa terhadap keberadaan protein menggunakan SDS PAGE dan terhadap potensinya dalam meningkatkan proliferasi dan atau menghambat diferensiasi *bone marrow mesenchymal cells (BMSCs)* tikus.

Sekreta protein dalam *CM-RFF* yang dikoleksi dari kultur primer, pasase 1, pasase 5, dan pasase 9 dianalisa menggunakan SDS PAGE, dilanjutkan dengan proses visualisasi protein menggunakan metode pewarnaan *silver nitrat*; serta analisa terhadap kemampuannya dalam meningkatkan proliferasi dan menghambat terjadinya diferensiasi *MSCs*.

Isolasi dan Kultur In Vitro Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Sumsum Tulang

Mesenchymal stem cells sumsum tulang dikoleksi dan diisolasi berdasarkan metode Nadri *et al.* (2007). Tulang tibia atau femur tikus dewasa dibilas dengan larutan PBS (tanpa Ca dan Mg) yang diberi tambahan FCS 0,1% dan gentamisin 50 µg/ml. Setelah dicuci dan disentrifugasi berturut-turut dengan medium mPBS dan mDMEM masing-masing sebanyak 3 dan 2 kali ulangan, pelet sel diresuspensi dalam medium kultur mDMEM. Kultur dilakukan dalam 3 cawan petri yang dialasi *cover glass* dan telah dilapisi dengan gelatin 0,1%. Sebanyak 1×10^5 sel/ml dikultur dalam 2 ml mDMEM, dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 37 °C. Setelah 24 jam kultur, dilakukan penggantian medium untuk mengeluarkan sel-sel yang tidak melekat, sementara *MSCs* memiliki kemampuan melekat lebih cepat dibanding sel-sel lainnya. Pada hari ketiga medium diganti dengan medium perlakuan mDMEM dengan *CM-RFF* 25% dengan dan tanpa LIF (Sigma) 10 ng/ml, dan dikultur sampai hari ke 10.

Penghitungan Konsentrasi dan Identifikasi MSCs

Konsentrasi sel dihitung menggunakan hemositometer *Neubauer*. Sedangkan untuk mengetahui persentase *MSCs*, dilakukan identifikasi berdasarkan morfologi dengan bantuan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) dan pewarnaan alkaline fosfatase (ALP) yang umumnya digunakan untuk mengidentifikasi

digunakan untuk mengevaluasi pluripotensi *embryonic stem cells* (O'Connors *et al.* 2008). Sel yang ditumbuhkan diatas *cover glass*, dicuci menggunakan PBS, kemudian difiksasi dalam larutan bufer paraformaldehida 4% selama 24 jam.

Pewarnaan ALP

Sel pada *cover glass* dicuci kembali menggunakan PBS selama 15 menit dan selanjutnya ditetesi dengan pewarna ALP selama 30 menit. Setelah pencucian dengan PBS selama 15 menit, *cover glass* diletak dan rekatkan diatas *object glass* dan diamati menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang berwarna merah adalah positif terhadap ALP dan mengindikasikan sifat pluripoten dan tingkat proliferasi yang tinggi. Sel yang berwarna merah dihitung per total sel yang diamati dalam 5 lapang pandang.

Pewarnaan HE

Setelah difiksasi preparat kultur sel direndam dalam alkohol 50% selama 2 jam kemudian disimpan dalam alkohol 70%. Preparat direndam alkohol 50% selama 3 menit kemudian aquades selama 5 menit. Pewarnaan dengan hematoksilin dilakukan selama 4 menit, kemudian dibilas *aquadest* dan diwarnai dengan eosin selama 2 menit. Selanjutnya preparat dibilas *aquadest* dan dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 96%, absolut, absolut, dan absolut masing-masing selama 10 menit. Proses *clearing* dilakukan di dalam xylol 1, 2, dan 3 dan preparat di-*mounting* pada gelas objek. Morfologi *MSCs* adalah sel-sel yang menyerupai sel mesenkhimal berukuran besar dengan bentuk sitoplasma tidak beraturan serta sel yang menyerupai fibroblast berbentuk lonjong memanjang.

Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Analisa terhadap pertumbuhan kultur sel fibroblas serta sekreta *CM-RFF* dilakukan secara deskriptif. Kultur sel-sel sumsum tulang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan berdasarkan kondisi medium yang digunakan yaitu (1) mDMEM, (2) mDMEM + LIF 10 ng/mL, (3) DMEM + *CM-RFF* 25%, dan (3) mDMEM + *CM-RFF* 25% dan LIF 10 ng/mL;

dengan masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Parameter yang diamati adalah persentase sel yang menyerupai mesenkimal dan fibroblas serta sel yang menunjukkan positif terhadap pewarnaan alkalin fosfatase (ALP). Data yang diperoleh dianalisa menggunakan uji statistik T-test dengan tingkat kepercayaan 95%.

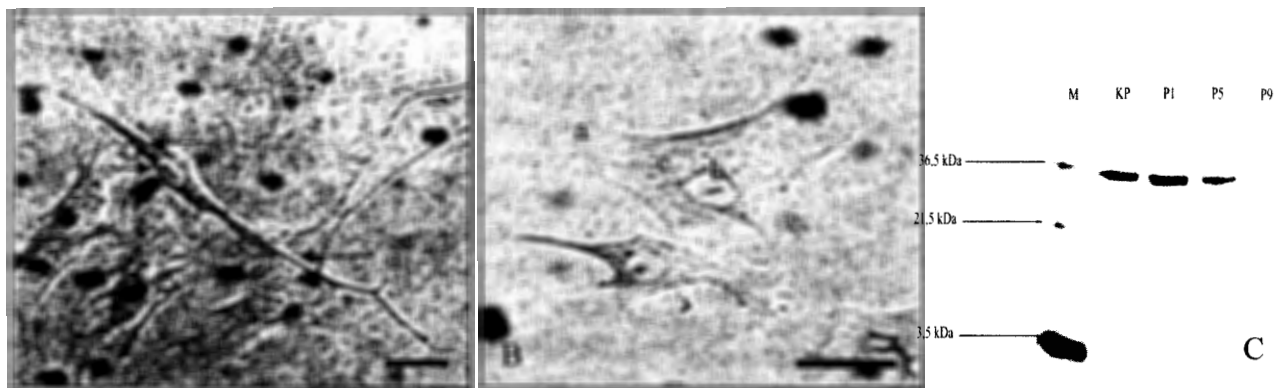
Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan dan Sekresi Protein Sel Fibroblas dalam Kultur In Vitro

Hasil pengamatan terhadap sel otot fetus tikus setelah 7 hari kultur menunjukkan adanya dua bentuk sel fibroblast, yakni yang berbentuk spindel pipih panjang dan berukuran lebih kecil serta yang berbentuk agak membulat besar dengan beberapa penjururan sitoplasma menyerupai sel mesenkimal (Gambar 1A, B). Berdasarkan Junqueira dan Carneiro (2005), yang berbentuk memanjang merupakan bentuk fibroblas inaktif (adakalanya disebut sebagai fibrosit; sedangkan yang berukuran besar merupakan bentuk aktif fibroblas. Hasil penghitungan jumlah sel fibroblas memperlihatkan terjadinya peningkatan jumlah

sel baik pada kultur primer maupun pada kultur galur sel setelah mengalami pasase. Kecepatan proliferasi dari sel-sel fibroblas menunjukkan adanya peningkatan seiring dengan dilakukannya pasase dengan PDT adalah 4,2; 3,7; 2,2 dan 1,9 masing-masing adalah pada kultur primer; pasase ke-1; ke-5, dan ke-9 (Tabel 1). Semakin cepat proses proliferasi (pembelahan) sel, maka PDT yang dicapai semakin cepat.

Pada kultur primer tampak bahwa PDT adalah 4,2 yang menunjukkan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk proses pembelahan sel adalah 4,2 hari, waktu ini jauh lebih tinggi dibandingkan waktu yang dibutuhkan untuk proses pembelahan sel secara *in vivo* yaitu berkisar 18–24 jam (Butler 2004). Hal ini disebabkan pada kultur primer komposisi sel masih belum homogen dan sel-sel belum beradaptasi dengan baik dengan lingkungan *in vitro*. Namun demikian, proses pasase yang terus menerus mengarahkan populasi sel menjadi semakin homogen dan sel telah mengalami adaptasi dengan kondisi lingkungan *in vitro*.



Gambar 1. A-B. Hasil kultur *in vitro* sel otot fetal tikus: A. Sel fibrosit dan B. Sel fibroblas. a. Penjururan sitoplasma; b. inti sel dan c. sitoplasma. Natif. C. Hasil SDS-PAGE *Conditioned medium Rat Fetal Fibroblast*. KP: kultur primer; P: pasase; M: marka berat molekul. Pewarnaan perak nitrat. Bar:20 μ m.

Tabel 1. Jumlah dan PDT sel fibroblas pada kultur *in vitro*

Galur	Jumlah sel awal	Jumlah sel akhir	PDT (hari)
Kultur primer	$6,0 \times 10^6$	16×10^6	4,2
Pasase 1	$2,4 \times 10^6$	6×10^6	3,7
Pasase 5	$1,2 \times 10^6$	3×10^6	2,2
Pasase 9	$2,0 \times 10^6$	6×10^6	1,9

Waktu yang dibutuhkan oleh sel untuk membelah semakin cepat dan bahkan setelah sel mengalami pasase ke 9, PDT menunjukkan nilai yang semakin mendekati kisaran waktu normal yang dibutuhkan untuk pembelahan secara *in vivo*. Menurut Freshney (2005) setelah pasase ke tiga, sel yang dikultur akan menjadi lebih stabil dan mampu berproliferasi dengan lebih cepat.

Hasil analisa CM-RFF menggunakan SDS-PAGE menunjukkan adanya beberapa sekreta protein dengan kisaran berat molekul (BM) antara dibawah 34 kDa – 21,5 kDa (Gambar 1C). Protein-proten tersebut disekresikan secara konsisten sampai dengan pasase ke 9. *Fibroblast growth factors* (FGFs) merupakan faktor pertumbuhan yang terdiri dari 22 anggota dengan kisaran BM antara 17 – 34 kDa dan masing-masing memiliki homologi sekitar 13-71% (David and Itoh 2001). Diantara FGFs, *basic fibroblast growth factor* (bFGF) atau FGF2 merupakan protein dengan BM 18 kDa dan memiliki bentuk alternatif isoform dengan BM 22,0 kDa, 22,5 kDa, 24,0 kDa dan 34,0 kDa. Protein FGF-2 dihasilkan oleh berbagai jaringan dan berperan dalam embriogenesis serta morfogenesis yakni berperan dalam pengaturan proliferasi, migrasi, dan diferensiasi (Berghe *et al.*2000).

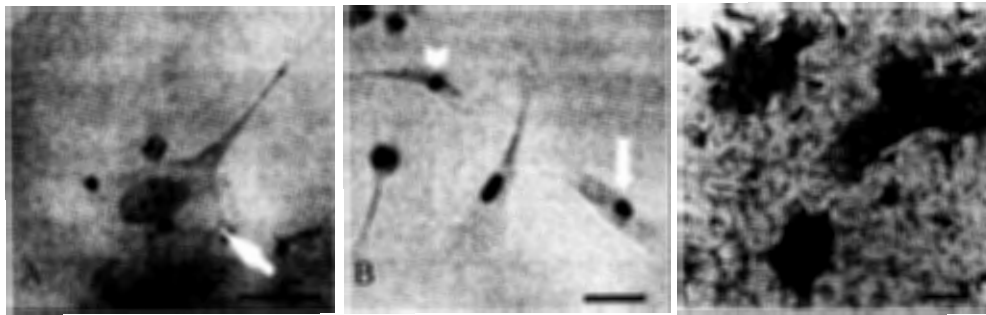
Pengaruh Penambahan Conditioned Medium Fibroblas Fetal Tikus (CM-RFF) terhadap Pertumbuhan Mesenchymal Stem Cells Sumsum Tulang

Berdasarkan metode Nadri *et al.* (2007), isolasi *mesenchymal stem cells* (MSCs) dari sumsum tulang dilakukan berdasarkan kecepatan sel-sel tersebut melekat di atas permukaan cawan yang telah dilapisi gelatin. *Mesenchymal stem cells* yang belum berdiferensiasi dapat diidentifikasi berdasarkan morfologinya, yakni yang memiliki

sitoplasma sedikit dan inti besar, bersifat basa lemah serta memiliki nukleolus (anak inti) satu buah atau lebih (Kuehnel 2003). Setelah 7 hari kultur *in vitro*, berdasarkan morfologi, dapat dibedakan beberapa jenis sel, diantaranya adalah sel yang menyerupai mesenkimal berbentuk besar dengan banyak penjururan sitoplasma, memiliki inti besar dan pucat, serta sel fibroblas yang berbentuk *spindle* lonjong memanjang. Karena identifikasi hanya dilakukan berdasarkan morfologi, kedua bentuk sel ini diduga sebagai *MSCs* (*MSCs like*) atau sel-sel yang menyerupai *MSCs* (Gambar 2A-B).

Setelah 10 hari kultur, terdapat sel-sel dengan morfologi *MSCs like* dan fibroblas, masing-masing sebanyak $11,8 \pm 5,4\%$ dan $36,0 \pm 6,2\%$ (Tabel 2). Sel-sel lainnya adalah menyerupai progenitor sel saraf (neuroblas) yakni memiliki ukuran kecil dengan penjururan akson yang panjang. Hal ini menunjukkan bahwa sel sumsum tulang memiliki kecenderungan untuk tumbuh dan berkembang menjadi progenitor sel saraf atau lingkungan kultur memberikan peluang untuk progenitor sel saraf tumbuh secara lebih dominan. Hal tersebut didukung oleh Sussman (2001) yang menyatakan bahwa di dalam medium kultur *MSCs* sumsum tulang mudah berdiferensiasi secara spontan menjadi berbagai jenis sel.

Untuk meningkatkan proliferasi *MSCs* serta menghambat diferensiasi, kedalam medium kultur (mDMEM) diberikan tambahan CM-RFF 25% dan atau LIF 10 ng/ml medium. Hasil kultur menunjukkan bahwa penambahan CM-RFF 25% kedalam mDMEM tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap peningkatan persentase *MSCs like*. Sebaliknya, secara signifikan mampu meningkatkan persentase sel fibroblas dari $36,0 \pm 6,2\%$ menjadi $63,9 \pm 4,4$.



Gambar 2. Kultur primer sel sumsum tulang pada hari ke-7. A. Bentuk sel mesenkimal fusiform (tanda panah) dan B. Bentuk sel mesenkimal (tanda panah) dan sel fibroblast (kepala panah). A-B. Pewarnaan HE. C. Sel-sel berwarna merah adalah positif terhadap pewarnaan alkaline phosphatase. Sel-sel berukuran kecil dengan penjurulan merupakan progenitor sel saraf. Bar 10 μ m.

Tabel 2. Persentase *mesenchymal stem cells-like* dan fibroblast yang berkembang dari sel sumsum tulang setelah 10 hari kultur dalam berbagai media perlakuan.

Media perlakuan	Jumlah (%)		Jumlah sel yang positif terhadap ALP
	<i>MSCs - like</i>	Fibroblas	
mDMEM	11,8 \pm 5,4 ^a	36,0 \pm 6,2 ^a	75,2 \pm 2,5 ^a
mDMEM+CM-RFF	24,1 \pm 7,3 ^a	63,9 \pm 4,4 ^c	74,1 \pm 1,9 ^a
mDMEM+LIF	37,3 \pm 2,4 ^b	48,3 \pm 4,5 ^b	85,2 \pm 2,6 ^b
mDMEM+LIF+CM-RFF	43,8 \pm 4,6 ^b	52,2 \pm 3,4 ^b	82,8 \pm 2,4 ^b

Dalam satu kolom huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$).

Hasil tersebut berlawanan dengan hasil penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa penambahan MEF kedalam medium kultur dapat menghambat proses diferensiasi (Greger *et al.* 2007; Rylova *et al.* 2008). *Conditioned medium* fibroblas fetus manusia dan mencit dilaporkan mensekresikan bermacam faktor pertumbuhan (*fibroblast growth factors/ FGFs*) diantaranya, *FGF-1*, *basic fibroblast growth factors* (bFGF) atau *IGF-2*, *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) dan *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1) yang berperan dalam proses pertumbuhan, pluripotensi serta diferensiasi dari *embryonic stem cells* (Levenstein *et al.* 2006; Prowse *et al.* 2007; Jeon *et al.* 2009). Dengan demikian, protein *FBFs* memiliki multifungsi dengan pengaruh yang bervariasi; *FBFs* memiliki 4 sub tipe reseptor namun dapat diaktifkan oleh lebih dari 20 ligan yang berbeda, karenanya beberapa molekul dapat berikatan dan memberikan respon hanya melalui sebuah reseptor (Green *et al.* 1996). Untuk itu, perlu dilakukan penentuan komposisi dan konsentrasi dari masing-masing protein sehingga dapat memberikan pengaruh yang lebih spesifik terutama kaitannya dengan fungsi peningkatan proliferasi dan menghambat diferensiasi. Penambahan LIF 10 ng/ml secara signifikan mampu meningkatkan persentase sel baik

MSCs-like maupun fibroblas. Pada perlakuan mDMEM yang diberi tambahan kombinasi LIF dan RFF tempat terjadi peningkatan secara signifikan persentase *MSCs-like*; namun hal tersebut lebih dikarenakan adanya unsur LIF. Hal ini dapat dilihat dari tidak adanya perbedaan nyata terhadap persentase sel antara perlakuan penambahan LIF dengan LIF dan RFF. Kehadiran LIF akan menghambat proses diferensiasi melalui jalur *signal transducer and activator of transcription* (STAT) (Moon *et al.* 2002).

Hasil pewarnaan ALP menunjukkan sekitar 75,2 \pm 2,5% menunjukkan reaksi positif terhadap ALP (Gambar 2C). Hal ini menunjukkan bahwa pewarnaan ALP kurang spesifik terhadap *MSCs*. Alkaline fosfatase diekspresikan pada sel yang berproliferasi dan metabolisme tinggi (Iida *et al.* 2007), namun enzim alkaline fosfatase juga terdapat pada progenitor sel darah, usus, hati, dan sel tulang. Hasil pewarnaan ALP menunjukkan bahwa penambahan CM-RFF tidak mampu meningkatkan persentase sel yang positif terhadap ALP. Sedangkan penambahan LIF 10ng/ml mampu secara signifikan meningkatkan persentase sel yang positif terhadap ALP.

Kesimpulan dan Saran

Hasil kultur *in vitro* sel-sel otot fetus tikus menunjukkan bahwa secara morfologi terdapat dua bentuk sel yakni fibroblas dan fibrosit dan berdasarkan nilai *population doubling time* kecepatan proliferasi meningkat pada setiap galur sel. Analisa *conditioned medium rat fetal fibroblast (CM-RFF)* menunjukkan adanya protein dan paling dominan berukuran sekitar 34 kDA. Pertumbuhan sel fibroblas dan sekreta protein dapat dipertahankan hingga pasase 9. Penambahan CM-RFF 25% secara signifikan mampu meningkatkan persentase sel dengan morfologi fibroblast, namun tidak mampu meningkatkan persentase *mesenchymal stem cells like* serta sel yang menunjukkan positif terhadap alkaline fosfatase. Sedangkan penambahan *Leukemia Inhibitor Factor* kedalam medium mDMEM secara signifikan mampu meningkatkan persentase baik *mesenchymal stem cells like* maupun fibroblas; serta sel yang menunjukkan positif terhadap alkaline fosfatase.

Daftar Pustaka

- Anonim. 2008. The influence of LIF (leukemia inhibitory factor) on functional status of mouse line R1 embryonic stem cells. *Biomed Khim* 54(5):570-576.
- Butler M. 2004. *Animal Cell Culture & Technology 2nd ed.* London: Bios Scientific Publisher, Taylor & Francis Group.
- Freshney RI. 2005. *Culture of Animal Cells a Manual Basic Technique 5th ed.* New York: Wiley-liss, a John Wiley & Sons, Inc, Pub.
- Gendall AR, Dunn AR, Ernst M. 1997. Isolation and charecterization of a Leukemia inhibitory factor-independent embryonic stem cell line. *Int J Biochem Cell Biol* 29(5):829-840.
- Green PJ, Walsh FS, Doherty P (1996). "Promiscuity of fibroblast growth factor receptors". *Bioessays* 18 (8):639-46.
- Greger B, C Hans, J. Adjave. 2007. Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Transforming Growth Factor _ Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts and Human ESCs (hESCs) to Support hESC Self-Renewal. *Stem Cells* 25:455-464.
- Hill EJ, Vernallis AB. 2008. Polarized secretion of leukemia inhibitory factor. *BMC Cell Biology* 9:53.
- Iida M, Ihara S, Matsuzaki T. 2007. Hair-cycle dependent changes of alkaline phosphatase activity in the mesenchyme and epithelium in mouse vibrissal follicles. *Dev Growth Dif* 49:185-195.
- Jeon E, Kim HW, Jang JH. 2009. Protein engineering of a fibroblast growth factor-1 fusion protein with cell adhesive activity. *Acta Biochim Biophys Sin* 41:852-857.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2005. *Basic Histology 11th ed.* USA: The McGraw-Hill Companies Inc.
- Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, Thomson JA. 2006. Basic Fibroblast Growth Factor Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells* 24:568-574.
- Mader SS. 2000. *Human Biology.* Iowa: McGraw Hill.
- Mallon BS, Park KY, Chen KG, Hamilton RS, McKay RDG. 2006. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1063-1075.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* 18:4261-4269
- Moon C, Yoo JY, Matarazzo V, Sung YK, Kim EJ, Ronnet GV. 2002. Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal

- differentiation through STAT3 activation. *PNAS* . 99 (13):9015-1920
- Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. 2007. An efficient methode for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 51:723-729.
- O'Connor, MD, MD Kardel, I Iosfina, D Youssef, M Lu, MM Li, S Vercauteren, A Nagy, CJ Eaves. 2008. Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26:1109–1116.
- Prowse ABJ, McQuade LR, Bryant KJ, Marcal H, Gray PP. 2007. Identification of Potential Pluripotency Determinants for Human Embryonic Stem Cells Following Proteomic Analysis of Human and Mouse Fibroblast Conditioned Media. *Journal of Proteome Research* 6:3796-3807.
- Rose JH. 2002. GP130 stimulation and the maintenance of stem cells. *Trends Biotechnol* 20:417–419.
- Rylova SN, Randhawa PK, Bautch VL. 2008. In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Primitive Blood Vessel. Di dalam Cheresch DA, editor. *Methods in Enzymology Volume 443 Angiogenesis In Vitro Systems*. London: Elsevier Inc.
- Sussman M. 2001. Cardiovascular biology. Hearts and bones. *Nature* 410:640–641
- Stocum DL. 2004. Regenerative biologi and medicine: An Overview. *Cells Science* 1(1)1-20
- Williams RL *et al.* 1988. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684–687.