

Magazin für die Medizin in Deutschland

# MKB

Deutsches Medical Journal

4

1900

1900

# Editorial Team

## Editor in Chief

1. [Henni Djuhaeni](#), Department of Public Health, Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran Bandung, Indonesia

## Secretary Editor

1. [Reni Ghrahani](#), Department of Child Health Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran/Dr. Hasan Sadikin General Hospital Bandung, Indonesia

## Senior Editor

1. [Herry Garna](#), Department of Child Health Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran/Dr. Hasan Sadikin General Hospital Bandung, Indonesia

## Editors

1. [Sri Endah Rahayuningsih](#), Department of Child Health Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran/Dr. Hasan Sadikin General Hospital Bandung, Indonesia
2. [Iрма Ruslina Defi](#), Department of Physical and Rehabilitation Science Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran/Dr. Hasan Sadikin General Hospital Bandung, Indonesia
3. [Sharon Gondodiputro](#), Department of Public Health, Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran Bandung, Indonesia
4. [Nur Melani Sari](#), Department of Child Health Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran/Dr. Hasan Sadikin General Hospital Bandung

## Language Editor

1. [Diba Artsiyanti Ediyana Putri Basar](#), Scientific Publication and Intellectual Property Rights Unit, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

## Layout Editor

1. [Devi Fabiola Syahfitri](#), Scientific Publication and Intellectual Property Rights Unit, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran, Indonesia

## Secretariat

1. [- Widiastuti](#), Scientific Publication and Intellectual Property Rights Unit, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran, Indonesia
2. [Ati Sulastri](#), Scientific Publication and Intellectual Property Rights Unit, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran, Indonesia
3. [Erlan Aditya Ardiansyah](#), Scientific Publication and Intellectual Property Rights Unit, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran, Indonesia
4. [Elza Purwita](#), Scientific Publication and Intellectual Property Rights Unit, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran, Indonesia, Indonesia

## Vol 43, No 4 (2011)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15395/mkb.v43n4>

### Table of Contents

#### Articles

- Efek Rimpang Kunyit (*Curcuma longa* L.) dan Bawang Putih (*Allium sativum* L.) terhadap Sensitivitas Insulin pada Tikus Galur Wistar PDF  
153-159  
Evi Sovia, Elin Yulinah Sukandar, Joseph I. Sigit, Lucy Dewi N. Sasongko
- Efek Ekstrak Air Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Muda terhadap Gambaran Histologi Kelenjar Mamma Mencit Laktasi PDF  
160-165  
Yuktiana Kharisma, Armaya Ariyoga, Herri S. Sastramihardja
- Ekspresi Bcl-2 dan Caspase-3 Pascapaparan Hipoksia Hipobarik Intermitten PDF  
166-170  
Achmad Hidayat, Kahdar Wiradisastra, Bethy S. Hernowo, Tri Hanggono Achmad
- Uji Fungsional dan Karakteristik Sel Punca Hematopoetik Hasil Isolasi dari Darah Tali Pusat Manusia Menggunakan Metode Modifikasi Unpad- Aster PDF  
171-177  
Tono Djuwantonono, Firman F. Wirakusumah, Leri Septiani, Ike Kristina, Devi Natalia, Danny Halim, Ahmad Faried
- Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion pada Bayi Kurang Bulan dan Cukup Bulan PDF  
178-182  
Sri Endah Rahayuningsih, Herry Garna
- Peran Lem Fibrin Otologus pada Penempelan Tandur Konjungtiva Bulbi Mata Kelinci terhadap Ekspresi Gen Fibronektin dan Integrin PDF  
183-188  
Sutarya Enus, Gantira Natadisastra, M. Nurhalim Shahib, Rachmat Sulaeman
- Paparan Debu Batubara Subkronik pada Peroksidasi Lipid dan Kadar Gula Darah Tikus Diabetes Melitus PDF  
189-192  
Agus Yuwono, Bambang Setiawan, Nia Kania, M. Aris Widodo
- Mutasi Gen NPHS2 (412C → T, 419delG) dan Manifestasi Klinis Sindrom Nefrotik Resisten Steroid Anak Indonesia PDF  
193-198  
Dedi Rachmadi, Dany Hilmanto, Ponpon Idjradinata, Abdurahman Sukadi

Polimorfisme Gen MMP-9, Ekspresi MMP-9, dan Indeks Apoptosis  
Sel Serviks pada Kehamilan 21–36 Minggu  
Udin Sabarudin, Johannes C. Mose, Sofie R. Krisnadi

PDF  
199-206

# Uji Fungsional dan Karakteristik Sel Punca Hematopoetik Hasil Isolasi dari Darah Tali Pusat Manusia Menggunakan Metode Modifikasi Unpad-Aster

Tono Djuwantono,<sup>1,2</sup> Firman F. Wirakusumah,<sup>1</sup> Leri Septiani,<sup>1,2</sup> Ike Kristina,<sup>2</sup> Devi Natalia,<sup>1</sup> Danny Halim,<sup>2</sup> Ahmad Faried<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Obstetri dan Ginekologi, <sup>2</sup>Grup Peneliti Sel Punca, Unit Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung

## Abstrak

Metode isolasi sel-sel mononuklear/*mononuclear cells* (MNCs) dari darah tali pusat (DTP) manusia secara konvensional menghasilkan tingkat kontaminasi sel eritrosit yang sangat tinggi. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah menilai perbedaan viabilitas dan kontaminasi sel eritrosit dalam populasi MNC DTP pada modifikasi metode isolasi yang kami kembangkan. Penelitian ini juga bertujuan untuk menguji fungsi dan karakteristik populasi MNCs dari DTP manusia sebagai dasar pembangunan bank darah tali pusat di Indonesia. Penelitian dilakukan di Departemen Obstetri dan Ginekologi RS Dr. Hasan Sadikin Bandung periode Januari–Oktober 2010. Isolasi MNCs dengan metode modifikasi (dinamakan modifikasi Unpad-Aster) yang menghasilkan  $5,1 \times 10^6$  sel/mL memiliki tingkat kontaminasi sel eritrosit yang lebih rendah dibandingkan dengan metode konvensional. Morfologi sel yang dibiakkan dalam medium *unrestricted somatic stem cells* (USSCs) tampak seperti sel-sel yang adheren (menempel di dasar), berbentuk sel *spindle*, dengan *cluster of differentiation-90* (CD-90) (antigen leukosit) dan *cluster of differentiation-105* (CD-105) yang positif serta dapat berdiferensiasi menjadi sel neuron dan adiposit; sedangkan morfologi untuk *cord blood-derived multipotent progenitor cells* (CB-MPCs) tampak seperti sel-sel fibroblas dengan *cluster of differentiation-45* (CD-45) (antigen hematopoetik) yang positif serta dapat berdiferensiasi menjadi sel neuron. Disimpulkan bahwa metode modifikasi Unpad-Aster memberikan tingkat kontaminasi eritrosit yang lebih rendah dibandingkan dengan metode konvensional. Sel mononuklear yang berasal dari darah tali pusat ini dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel neuron dan adiposit. [MKB. 2011;43(4):171–7].

**Kata kunci:** Darah tali pusat (DTP), diferensiasi, karakterisasi, modifikasi Unpad-Aster, sel mononuklear

## Functional Test and Characteristic of Hematopoietic Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood Using Unpad-Aster's Modified Method

### Abstract

The conventional method of mononuclear cells (MNCs) isolation from human umbilical cord blood (UCB) yielded high erythrocyte contamination level. Therefore, the aim of this study was to assess the differences of cell viability and erythrocyte contamination on the population of UCB MNCs in our modified isolation method. This study was also aimed to test the function and characteristic of human MNCs derived from UCB as the basis for the development of UCB banking in Indonesia. The study was conducted in Department of Obstetry and Gynecology RS Dr. Hasan Sadikin Bandung in period of January–October 2010. The modified isolation method (namely Unpad Aster's modification) yielded  $5.1 \times 10^6$  MNC cell/mL has lower erythrocyte contamination level than conventional method. The morphology of MNCs cultured in *unrestricted somatic stem cells* (USSCs) medium looked like adhered cells (attached at the surface of culture flask), spindle-shaped cells with positive luster of *ifferentiation-90* (CD-90) (leukocyte antigen) and *cluster of differentiation-105* (CD-105) and could differentiate into neuronal cells and adipocytes. While the morphology of cord blood-derived multipotent progenitor cells (CB-MPCs) looked like fibroblast cells with positive *cluster of differentiation-45* (CD-45) (antigen hematopoietic) and could differentiate into neuronal cells. In conclusions, the Unpad-Aster's modified isolation method gives lower level of erythrocyte contamination compared with conventional method. Mononuclear cells derived from UCB could differentiate into neuronal cells and adipocytes. [MKB. 2011;43(4):171–7].

**Key words:** Characteristic, differentiation, mononuclear cells (MNCs), umbilical cord blood, Unpad-Aster modification

---

**Korespondensi:** Dr. Tono Djuwantono, dr., Sp. OG(K)., M.Kes, Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-RS Dr. Hasan Sadikin Bandung, jalan Pasteur 38 Bandung, telepon (022) 2032530, mobile 0811225060, e-mail djuwantono@yahoo.com

## Pendahuluan

Sel punca (*stem cells/SCs*) dapat berproliferasi dan menghasilkan sel-sel dengan karakteristik yang sama dengan dirinya, serta dapat berdiferensiasi menjadi sel dengan bentuk dan fungsi yang lebih spesifik. Dikenal dua golongan sel punca, yaitu sel punca embrionik dan sel punca dewasa. Sel punca embrionik berasal dari embrio stadium blastosis, sedangkan sel punca dewasa seperti sel punca hematopoetik berasal dari jaringan yang mengalami maturasi seperti sumsum tulang, darah perifer, dan darah tali pusat (DTP).<sup>1-3</sup>

Sel punca memiliki tiga ciri utama, yaitu: (1) berada dalam keadaan yang primitif, (2) mampu berproliferasi dan menghasilkan sel dengan karakteristik yang sama dengan sel induknya (*self renewal*), dan (3) mampu berdiferensiasi menjadi sel dengan bentuk dan fungsi yang lebih spesifik.<sup>2</sup> Walaupun memiliki potensi diferensiasi dan proliferasi yang lebih dibandingkan sel punca dewasa, sel punca embrionik terus menghadapi hambatan, terutama masalah etik. Hambatan tersebut diatasi dengan ditemukannya sumber sel punca dewasa oleh Broxmeyer dkk.<sup>4</sup> yang menunjukkan DTP kaya akan sel punca dewasa.

Bukti keberhasilan transplantasi DTP pertama kali dipublikasikan pada tahun 1988. Transplantasi DTP dilakukan pada seorang penderita anemia Fanconi yang menerima darah tali pusat adik perempuannya. Saat ini, transplantasi sel punca hematopoetik DTP diketahui dapat digunakan untuk menyembuhkan kelainan hematopoetik baik ganas maupun jinak.<sup>5-7</sup>

Tahap penyimpanan DTP merupakan langkah penting yang menentukan kualitas dan jumlah sel punca untuk digunakan di kemudian hari. Terkait dengan hal tadi, efektivitas protokol simpan beku dipengaruhi oleh beberapa faktor utama, seperti laju pendinginan (*freezing*), laju penghangatan (*thawing*), jenis komposisi krioprotektan, serta suhu penambahan atau pembuangan krioprotektan.<sup>8</sup> Faktor-faktor tersebut perlu disesuaikan dengan sifat dan karakteristik setiap spesimen biologis yang akan disimpan beku.

Darah tali pusat mengandung banyak sel muda, termasuk di dalamnya sel eritrosit berinti. Hal ini mengakibatkan potensi terjadinya kontaminasi pada hasil isolasi *mononuclear cells* (MNCs) DTP dibandingkan dengan mengisolasi MNCs dari darah tepi orang dewasa. Bila mengikuti protokol yang ada, akan didapatkan banyak sekali sel eritrosit muda yang mengontaminasi MNCs DTP.<sup>9</sup> Dalam rangka mengoptimalkan teknik isolasi, kami memodifikasi metode isolasi serta menguji keberhasilan vitrifikasi pada MNCs DTP, jenis protokol uji lainnya, seperti *colony forming unit-culture* (CFU-C), uji fungsi, dan karakteristik dilakukan pada percobaan ini.

## Metode

Darah tali pusat (DTP) ibu yang bersalin cukup bulan di Departemen Obstetri dan Ginekologi RS Dr. Hasan Sadikin Bandung sejak Januari–Oktober 2010, yang memenuhi kriteria sebagai berikut: DTP ibu bersalin cukup bulan, persalinan tunggal hidup, usia ibu bersalin <35 tahun, serta DTP ibu bersalin yang tidak terinfeksi oleh hepatitis B dan *human immunodeficiency virus* (HIV) dibuktikan dengan pemeriksaan HBsAg dan HIV (setelah dilakukan konseling pemeriksaan sesuai dengan prosedur standar pemeriksaan HIV). Dari perhitungan statistik didapatkan besar sampel untuk setiap kelompok perlakuan sebanyak 10.

Calon donor harus sudah melengkapi dan memahami *informed consent* yang berisi penjelasan mengenai tujuan penelitian dan prosedur pengumpulan DTP, kemungkinan risiko dan keuntungannya, aspek medis dan etika, serta hak untuk menolak tanpa merasa bersalah. Adapun teknik pengumpulan DTP sebagai berikut: tali pusat diklem dan dipotong sedekat-dekatnya dengan bayi dan dilakukan segera setelah bayi lahir. Tempat penusukan jarum pengadaan DTP diolesi betadin/alkohol 70%. Jarum terhubung dengan kantong koleksi darah ditusukkan pada pembuluh vena di daerah penusukan yang telah disiapkan sebelumnya. Volume DTP yang didapat umumnya 80–120 mL. Setelah aliran darahnya berhenti, jarum dikunci atau kantong ditutup. Darah tali pusat harus berada pada suhu kamar. Kantong dibolak-balikkan agar darah tercampur dengan antikoagulan.

Darah tali pusat diencerkan dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dengan perbandingan 1:1. Secara perlahan, DTP dimasukkan ke dalam tabung yang sebelumnya telah diisi *Ficoll hypaque* dengan perbandingan *Ficoll* terhadap DTP-PBS 1:2, lalu disentrifugasi selama 30 menit pada 300 g. Lapisan MNCs hasil sentrifugasi dikoleksi dan dimasukkan kembali ke dalam tabung yang telah berisi *Ficoll* dengan perbandingan 1:1, lalu disentrifugasi selama 30 menit pada 300 g. Pelet yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung baru lalu dicuci dengan *phosphate buffer saline albumin* (PBSA 2%) selama 10–15 menit pada 300 g. Setelah itu pelet yang terbentuk dikumpulkan untuk dilakukan penghitungan jumlah sel.

Darah tali pusat diencerkan dengan *minimal essential medium* (MEM) dengan perbandingan 1:1. Campuran DTP-PBSA 2% kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi *Ficoll* dengan perbandingan DTP-PBSA terhadap *Ficoll* 2:1, lalu disentrifugasi selama 30 menit pada 300 g pada suhu ruang. Lapisan MNC dan *Ficoll* hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam tabung secara terpisah. Kedua tabung yang masing-masing berisi MNCs dan *Ficoll*

selanjutnya disentrifugasi pada 300 g selama 15 menit pada suhu ruang. Pelet yang terbentuk pada masing-masing tabung lalu dikumpulkan ke dalam satu tabung baru. Pelet kemudian dicuci dengan PBSA 2% pada 300 g selama 15 menit. Pelet yang terbentuk selanjutnya dikumpulkan.

Sampel sel mononuklear yang telah diisolasi lalu dikultur menggunakan medium untuk USSCs. Jumlah sel yang ditanam dalam *flask* kultur berukuran 25 cm<sup>2</sup> sebanyak 5–7x10<sup>6</sup> sel/mL. Sel diinkubasi dalam incubator CO<sub>2</sub> dengan kelembaban 96%, kadar CO<sub>2</sub> 5%, dan temperatur 37 °C selama 2–4 minggu, medium kultur diganti setiap 3 hari. Setelah terbentuk koloni *unrestricted somatic stem cells* (USSCs), diperbanyak menggunakan medium kultur khusus untuk perbanyak sel. Sel kembali diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Setelah USSCs mencapai kepadatan 80%, sel dilepaskan dari permukaan *flask* menggunakan 0,05% tripsin/*ethylene diamine tetra acid* (EDTA) dan USSCs ditanam kembali dalam medium kultur yang sama dengan dilusi 1:3.

Sampel MNCs yang telah diisolasi lalu dikultur menggunakan medium yang sesuai untuk *cord blood-derived multipotent progenitor cells* (CB-MPCs). Jumlah sel yang ditanam dalam *flask* kultur berukuran 25 cm<sup>2</sup> sebanyak 3 x10<sup>5</sup> sel/mL. Sel diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan kelembaban 96%, kadar CO<sub>2</sub> 5%, dan temperatur 37 °C selama 2–4 minggu, medium kultur dan sitokin diganti setiap 3 hari. Sel-sel diresuspensi dengan 0,05% tripsin/*ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA). Sel kembali ditanam dalam *flask* kultur baru dengan jumlah sel sebanyak 1x10<sup>6</sup> sel/mL. Setelah CB-MPCs mencapai kepadatan 80%, sel dilepaskan dengan 0,05% tripsin/EDTA dan sel kembali di-*replate* dengan dilusi 1:3 menggunakan medium dan kondisi kultur yang sama.

Pengukuran viabilitas MNCs dilakukan dengan menggunakan hemasitometer. Pewarna yang digunakan *trypan blue* 0,4%. Sel yang telah diwarnai kemudian dihitung menggunakan mikroskop *inverted*.

Ekspresi sel marker CD dilakukan dengan anti-CD-34, CD-45, CD-90, CD105-FITC (BD348053) dengan metode *fluorescence activated cell sorting* (FACS).

Isolasi *ribonucleic acid* (RNA) menggunakan RNA *easy mini-kit* (Qiagen). Primer yang digunakan Oct4 5'-CTCTGAGGAGTGGGGGATTC-3'; 5'-TTGTGCATAGCCACTGCTTG-3'; Rex1 5'-CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT-3'; 5'-GCGTACGCAAATTA AAGTCCAGA-3'; Sox2 5'-AGTCTCCAAGCGACGAAAAA-3'; 5'-GGAAAGTTGGGATCGAACAA-3'; Nestin 5'-AGGATGTGGAGGTAGTGAGA-3'; 5'-TGGAGATCTCAGTGGCTCTT-3'; GAPDH

5'-TGAAGGTCCGAGTCAACGGA TTTGG-3'; 5'-CATGTAGGCCATGAGGTC CACCAC-3'. Hasil amplifikasi *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dipisahkan dengan elektroforesis pada 1% agarose gel dalam 0,5% bufer *tris-borate-EDTA* (TBE).

Penghitungan dan analisis statistik dikerjakan dengan menggunakan piranti lunak SPSS *for Windows version* 13.

## Hasil

Isolasi sel mononuklear menghasilkan endapan/pelet berwarna merah di dasar tabung dengan metode konvensional (Gambar 1A). Setelah di-*plating*, ternyata terlihat populasi eritrosit, merupakan populasi yang tidak diharapkan, jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan populasi sel MNCs (Gambar 1A).

Sebaliknya, hasil isolasi sel mononuklear menggunakan metode modifikasi Unpad-Aster tidak menghasilkan endapan berwarna merah pada dasar tabung melainkan hanya endapan putih saja (Gambar 1B kiri). Ketika endapan di-*plating* dalam cawan kultur, ditemukan jumlah eritrosit yang sangat sedikit dalam populasi sel-sel mononuklear (Gambar 1B, eritrosit ditunjukkan dengan tanda panah merah).

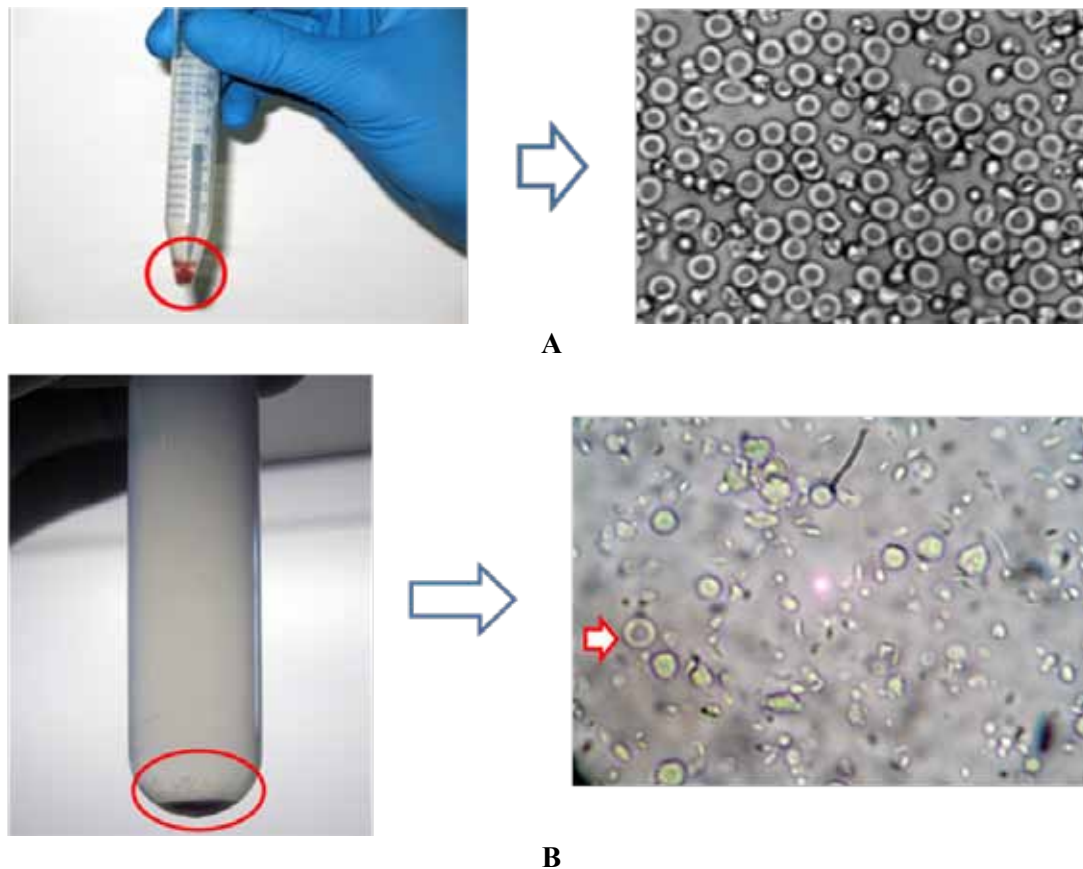
Jumlah dan viabilitas sel mononuklear yang diisolasi dari 80 mL DTP menggunakan teknik isolasi modifikasi Unpad-Aster. Dari volume darah yang diambil, yaitu sebanyak 80 mL, dihasilkan jumlah sel mononuklear rata-rata sebanyak 5,1x10<sup>6</sup> sel/mL dengan viabilitas 97% (Tabel 1).

Sel mononuklear hasil isolasi dari DTP manusia yang dikultur dalam medium khusus untuk USSCs dan CB-MPCs membentuk koloni USSC (Gambar 2A) dan CB-MPC (Gambar 2B).

Koloni USSC yang dianalisis menggunakan *flowcytometry assay* (FACS) untuk mengetahui ekspresi antigen permukaan CD-90 dan CD-105 menunjukkan hasil positif untuk anti-CD-90 (Gambar 1A) dan anti-CD-105 (Gambar 1B) yang merupakan ciri khas USSC.

Koloni USSC yang dikultur menggunakan medium neurobasal dan ditambahkan dengan *retinoid acid* (RA) serta *brain derived nerve factor* (BDNF) berdiferensiasi sel-sel saraf. Hasil pengamatan dengan mikroskop fluorosens menunjukkan bahwa sel-sel yang berdiferensiasi menjadi sel saraf terlihat berwarna hijau (marker TUJ-1), sel glial berwarna merah (marker GFAP), dan inti sel berwarna biru (marker ToPro3) (Gambar 3).

Hasil analisis ekspresi antigen permukaan pada sel mononuklear menggunakan *flowcytometry*



**Gambar 1 (A) Kontaminasi pada Populasi Sel MNCs DTP oleh Sel-sel Eritrosit Muda pada Penggunaan Metode Isolasi Konvensional, (B) MNCs DTP Hasil Isolasi Menggunakan Metode Modifikasi Unpad-Aster**

Kontaminasi oleh sel eritrosit jauh lebih rendah dibandingkan dengan hasil isolasi metode konvensional (panah merah menunjukkan sel eritrosit yang mengontaminasi populasi sel mononuklear)

(FACS) untuk melihat karakteristik CB-MPCs menunjukkan bahwa sel mononuklear memiliki CD-45/positif (antigen hematopoetik) dan tidak memiliki CD-90/negatif (antigen leukosit) (Gambar 2).

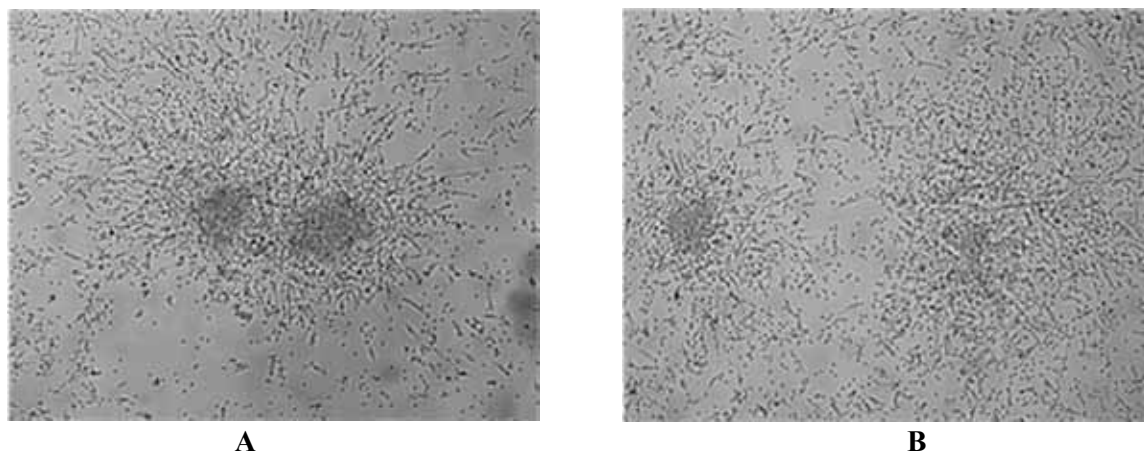
Sel-sel CB-MPCs diarahkan untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel saraf, diwarnai menggunakan

*marker class III beta-tubulin (TUJ-1)* (sel saraf), *glial fibrillary acidic protein (GFAP)* (sel glial), serta ToPro3 (inti sel), dan kemudian diamati dengan mikroskop fluoresens. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sel-sel CB-MPCs dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel saraf (berwarna hijau) dan sel-sel glial (merah). Inti sel CB-MPCs

**Tabel 1 Jumlah dan Viabilitas Sel Mononuklear dari Darah Tali Pusat (DTP) dengan Teknik Isolasi Modifikasi Unpad-Aster**

Donor Nomor	Volume DTP (mL)	Jumlah Sel/mL (x 10 <sup>6</sup> )	Viabilitas (%)
1	80	6	99
2	80	4,2	93
3	80	4,5	97
4	80	5,6	98
5	80	5,2	98
Rata-rata	80	5,1	97



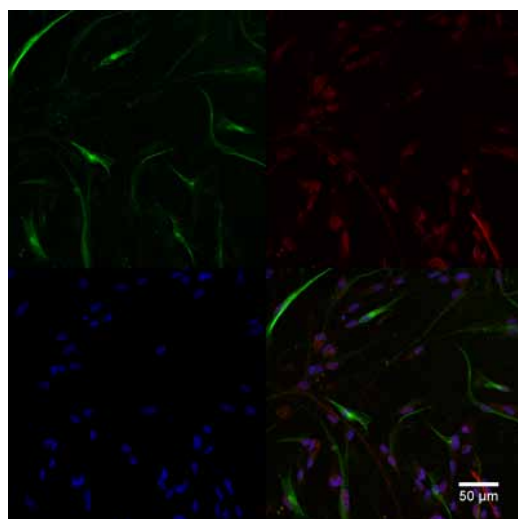


Gambar 2 (A) CFU-Colony Sel USSCs dan (B) CFU-Colony Sel CB-MPCs

ditunjukkan oleh warna biru (Gambar 4A).

Hasil pengamatan dengan mempergunakan mikroskop fluoresens terhadap kelompok sel CB-MPCs yang telah diwarnai dengan nestin dan BrDu menunjukkan bahwa sel CB-MPCs masih memiliki karakteristik sel progenitor (ditunjukkan dengan pewarnaan nestin warna hijau) dan memiliki proliferasi yang cepat (ditunjukkan dengan pewarnaan BrDu yang warna merah) (Gambar 4B).

Hasil analisis gen CB-MPC menggunakan RT-PCR menunjukkan faktor-faktor transkripsi yang terlibat dalam karakteristik sel stem (Oct4 dan Sox2) juga marker sel saraf dan juga progenitornya (Rex1 dan Nestin) (Gambar 3).



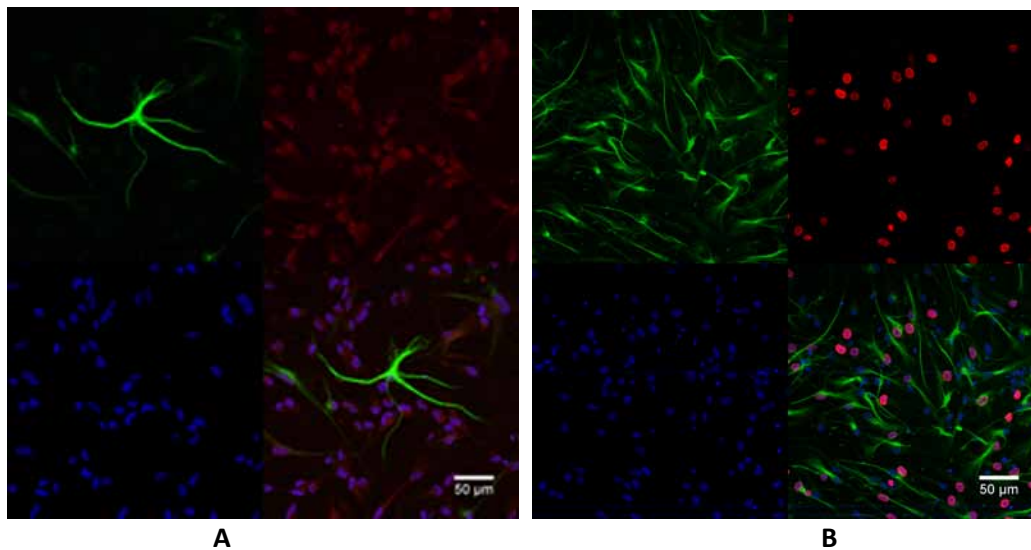
Gambar 3 USSCs yang Berdiferensiasi Menjadi Sel Saraf (TUJ-1 Hijau), Sel Glial (GFAP Merah), Inti Sel (ToPro3 Biru) dan Gabungan (Merge). Bar: 50 µm

## Pembahasan

Darah tali pusat mengandung banyak sel yang masih muda, termasuk di dalamnya sel eritrosit yang masih memiliki inti, dan hal ini mengakibatkan potensi untuk terjadinya kontaminasi pada hasil isolasi MNCs DTP (terdapatnya sel eritrosit muda) (Gambar 1A) dibandingkan dengan mengisolasi MNCs dari darah tepi orang dewasa—menggunakan teknik yang sama. Bila mengikuti protokol konvensional, akan didapat banyak sel eritrosit muda yang mengontaminasi populasi MNCs DTP,<sup>9,10</sup> untuk memurnikan MNCs DTP kami mengembangkan metode yang kami sebut teknik modifikasi Unpad-Aster (Gambar 1B). Modifikasi ini memberikan hasil yang sangat memuaskan dengan jumlah sel sebanyak  $5,1 \pm 0,75 \times 10^6/\text{mL}$  dari 80 mL DTP, viabilitas  $97\% \pm 2,3\%$  dan tingkat kontaminasi yang lebih rendah dibandingkan dengan tingkat kontaminasi pada hasil isolasi dengan metode konvensional.

Keuntungan modifikasi Unpad-Aster ini tidak perlu menggunakan alat sentrifugator dengan kecepatan tinggi yang dikontrol suhunya, menggunakan MEM sebagai pengencer darahnya yang sangat mudah didapat dan terjangkau harganya, hanya menggunakan sedikit larutan *Ficoll gradient*, total biaya yang dipergunakan untuk isolasi relatif murah, sel yang didapatkan cukup banyak dengan rata-rata  $5,1 \times 10^6/\text{mL}$ . Akan tetapi, pencapaian jumlah MNCs DTP untuk pelayanan di rumah sakit harus lebih dioptimalkan.

Dengan menggunakan teknik yang biasa dipakai, DTP dapat diperoleh hingga ~200 mL dan akan mengandung  $4 \times 10^6$  sel progenitor mieloid.<sup>11</sup> Pada penelitian ini kami mendapatkan sel sebanyak  $5,1 \pm 0,75 \times 10^6/\text{mL}$  dari 80 mL DTP. Pada riset ini,



**Gambar 4 (A) CB-MPCs yang Berdiferensiasi Menjadi Sel Saraf (TUJ-1 Hijau), Sel-sel Glial (GFAP Merah), (Inti Sel ToPro3 Biru) dan Gabungan (Merge). Bar: 50 µm; (B) CB-MPCs yang Memiliki Ciri Sel-sel Progenitor (Nestin Hijau), Proliferasi (BrDU Merah), Inti Sel (ToPro3 Biru), Gabungan (Merge). Bar: 50 µm**

DTP setiap penderita dikumpulkan sebanyak 80–100 mL. Beberapa penelitian terdahulu menemukan bahwa di dalam 1 mL DTP terkandung  $\pm 8.000$  sel progenitor eritroid primitif (BFU-E), 13.000–24.000 sel progenitor mieloid (*colony-forming units-granulocyte/macrophage* [CFU-GM]), dan 1.000–10.000 sel progenitor multipoten (*CFU granulocyte/erythroid/macrophage/megakaryocyte*: GEMM).<sup>12-14</sup>

*Colony forming unit in culture* (CFU-C) assay dari USSCs dan CB-MPC isolasi MNCs UCB ditunjukkan pada Gambar 2. Morfologinya tampak seperti sel-sel fibroblas dan memiliki kapasitas berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel di antaranya sel osteoblas, endotel, *hepatic*, neuron yang mewakili tiga lapisan embrio (mesoderm, endoderm, dan ektoderm). Ekspresi antigen permukaan dievaluasi dengan *flowcytometry assay* (FACS); MNCs DTP tadi dibiakkan dulu selama 2–3 minggu. Marker yang dipakai untuk melihat ciri khas USSCs pada penelitian ini; dengan marker negatif CD-34, CD-45 (antigen hematopoetik) dan marker positifnya CD-90 (antigen leukosit) dan CD-105 (Gambar 1).<sup>15</sup>

Tahap selanjutnya menjadikan USSCs ini menjadi sel-sel saraf (neuron). Medium yang dipergunakan yaitu medium neurobasal yang ditambahkan dengan faktor pertumbuhan, terutama *retinoic acid* (RA) dan *brain derived nerve factor* (BDNF). Marker yang dipakai untuk melihat ciri neuron-USSCs: TUJ-1 (sel saraf), GFAP (sel glial), dan ToPro3 (inti sel) dengan teknik mikroskop fluoresens (Gambar 3B). Pada pengamatan selanjutnya didapatkan

sekelompok sel USSCs ini yang berdiferensiasi menjadi sel lemak (adiposit); ditemukannya vakuola lemak interselular ditandai dengan pewarnaan minyak *red-O* (tidak ditampilkan). Medium pertumbuhannya ditambahkan dengan deksametason, indometasin, dan insulin.

Meskipun kami dapat mengarahkan MNC DTP ini menjadi sel-sel jenis selain sel darah yang merupakan asal usulnya (transdiferensiasi) tetapi angka keberhasilannya masih sangat rendah, ditandai hanya sebagian kecil saja MNC DTP tadi menjadi sel neuron dan adiposit.

Marker yang dipakai pada penelitian ini untuk melihat ciri CB-MPCs; dengan marker positif CD-45 (antigen hematopoetik) dan marker negatifnya CD-90 (antigen leukosit) (Gambar 2). Tahap selanjutnya menjadikan sel CB-MPCs ini menjadi sel saraf. Medium pertumbuhan yang dipergunakan berupa medium neurobasal yang ditambahkan, terutama dengan penambahan *retinoic acid* (RA) dan *brain derived nerve factor* (BDNF). Marker yang dipakai untuk melihat ciri-ciri sel neuron-CB-MPCs: TUJ-1 (sel saraf), GFAP (sel glial), dan ToPro3 (inti sel) dengan mikroskop fluoresens (Gambar 4A).

Pada pengamatan selanjutnya dapat diamati sekelompok sel CB-MPCs ini yang masih memiliki sifat atau ciri sel progenitor (sel *intermediate filament*) dan pertumbuhan yang cepat; ditandai dengan pewarnaan nestin (progenitor) dan BrDU (proliferasi, Gambar 4B) yang dilihat dengan menggunakan mikroskop fluoresens.

Meskipun kami dapat mengarahkan MNCs

DTP ini menjadi sel-sel jenis selain sel darah yang merupakan asal usulnya (transdiferensiasi), akan tetapi angka keberhasilannya masih sangat rendah, ditandai hanya satu atau dua MNCs DTP yang menjadi sel neuron, mengingat jumlah sel-sel progenitor mudanya yang sangat banyak ditandai oleh marker nestin.

Untuk menunjukkan ekspresi gen multipotensi CB-MPCs dilakukan analisis RT-PCR dari gen *Oct4*, *Sox2*, *Rex1*, dan nestin (Gambar 3). Analisis pada mRNA level menunjukkan bahwa faktor transkripsi terlibat untuk menjaga sifat sel stemnya (*Oct4* dan *Sox2*) dan juga tampak ekspresi marker dari sel-sel saraf serta progenitornya (*Rex1* dan nestin).

Dapat disimpulkan bahwa metode isolasi MNCs dari DTP manusia modifikasi Unpad-Aster menghasilkan jumlah sel mononuklear yang cukup tinggi serta tingkat kontaminasi eritrosit yang lebih rendah daripada metode isolasi MNCs konvensional. Sel mononuklear yang telah ditidurkan dengan vitrifikasi berhasil direaktivasi (dibangunkan) serta dapat dilakukan uji fungsi dan masih dapat diarahkan menjadi sel-sel tertentu yang bukan asalnya (transdiferensiasi); seperti sel neuron dan adiposit. Penggunaan protokol isolasi hasil modifikasi tim penelitian ini dapat meningkatkan viabilitas sel mononuklear dari darah tali pusat dan mengurangi kontaminasi sel eritrosit. Populasi sel mononuklear dari darah tali pusat pascavitrifikasi dapat dibiakkan dengan medium USSCs dan CB-MPCs. Dari kedua jenis biakan di atas, USSCs lebih mudah tumbuh serta lebih mudah diarahkan menjadi sel yang dikehendaki dibandingkan dengan CB-MPCs. Komposisi medium kultur dan konsentrasi faktor-faktor pertumbuhan dapat mempengaruhi keberhasilan karakteristik MNCs DTP.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini mendapatkan hibah dari Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Unpad melalui program Hibah Andalan Unpad 2010 dan didanai oleh Hibah Riset Fakultas Kedokteran Unpad untuk TD, LS, dan AF.

### Daftar Pustaka

1. National Institute of Health. Stem cell: scientific progress and future research directions. Washington: US Department of Health; 2001.
2. Fontes PA, Thomson AW. Stem cell technology. *BMJ*. 1999;319:1308–10.
3. Committee on Establishing a National Cord Blood Stem Cell Bank Program. Cord Blood: Establishing a National Hematopoietic Stem Cell Bank Program. Washington: National Academy of Science; 2005.
4. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantation hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:3828–32.
5. Agarwal MB. Umbilical cord blood transplantation: newer trends. *JAPI*. 2006;54:143–7.
6. Ballen KK, Barker JN, Stewart SK, Greene MF, Lane TA. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:356–63.
7. Armson BA, Crane J, Brunner M, Delisle MF, Farine D, Keenan-Lindsay L, dkk. Umbilical cord blood banking: implications for perinatal care providers. *J Obstet Gynaecol Can*. 2005;27(7):673.
8. Spurr EE, Wiggins NE, Marsden KA, Lowenthal RM, Ragg SJ. Cryopreserved human hematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5–14) cryostorage. *Cryobiology*. 2002;44:210–7.
9. Au P, Daheron LM, Duda DG, Cohen KS, Tyrrell JA, Lanning RM, dkk. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood*. 2008;111:1302–30.
10. Assmus B, Tonn T, Seeger FH, Yoon C, Leistner D, Volker JK, dkk. Red blood cell contamination product impairs the efficacy autologous bone marrow mononuclear cell therapy. *J Am College Cardiol*. 2010;55(13):1385–94.
11. Chularojmontri L, Wattanapiyatakul SK. Isolation and characterization of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *J Med Assoc Thai*. 2009;92(3):88–94.
12. Lee MW, Jong IK, Yoo KH, Sung KW, Koo HH. Stem and progenitor cells in human umbilical cord blood. *Int J Hematol*. 2010;92(45):45–51.
13. Kaufman DS, Hansin ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *PNAS*. 2001;98(19):10716–21.
14. McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navran S, Zhao J, Urban R, dkk. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif*. 2005;38:245–55.
15. Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cell. *Clin Exp Med*. 2003;3:140–14.