

POTENSI TRANSDIFERENSIASI SEL FIBROBLAS MENJADI SEL SARAF SECARA *IN VITRO*

Transdifferentiation Potency of Fibroblast Cell to Neuron Cell in Vitro

Ekayanti M. Kaiin¹ dan Ita Djuwita²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong

²Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor
E-mail: ekayantimk@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk menguji potensi sel fibroblas mengalami transdiferensiasi menjadi sel saraf secara *in vitro*. Penyiapan *newborn rat neuron conditioned medium* (NBRN CM) dilakukan dengan mengkultur sel saraf yang dikoleksi dari anak tikus yang baru lahir sampai mencapai tahap konfluen, kemudian medium diganti dengan medium *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) tanpa serum. Setelah 48 jam, medium dikoleksi sebagai NBRN CM. Sel fibroblas dikoleksi dari jaringan otot fetus tikus yang didisosiasi menggunakan tripsin. Sel fibroblas kemudian dikultur dengan 3 perlakuan medium yaitu: mDMEM + β -merkaptotanol 0,01 mM; mDMEM + NBRN-CM 50% dan mDMEM + β -merkaptotanol 0,01 mM + NBRN CM 50%. Sebagai kontrol, sel fibroblas dikultur dengan mDMEM ditambah *newborn calf serum* (NBCS) 10%. Penambahan NBRN CM ke dalam medium kultur menghasilkan sel saraf sebesar 12,97 % pada kultur sel fibroblas pasase ke-1. Penambahan β -merkaptotanol ke dalam medium kultur meningkatkan persentase sel saraf yang ditemukan (14,60%). Hasil yang serupa terjadi pada kultur sel fibroblas pasase ke-3 (12,67%; 13,17%). Hal ini menunjukkan bahwa sel fibroblas berpotensi mengalami transdiferensiasi menjadi sel saraf pada saat diinduksi dengan medium kultur sel saraf (NBRN CM). Perlu penelitian lebih lanjut untuk melihat potensi transdiferensiasi sel fibroblas.

Kata kunci: fibroblas, transdiferensiasi, *conditioned medium*, sel saraf, *in vitro*

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the potency of fibroblast cells transdifferentiated to neuron cells *in vitro*. *Newborn rat neuron conditioned medium* (NBRN CM) was collected from neuron cells cultured with mDMEM without serum for 48 hours. Fibroblast cells were collected from fetal rat muscle treated with trypsin. Fibroblast cells were culture with 3 kind of culture medium: mDMEM + 0.01 mM β -mercaptoethanol; mDMEM + 50% NBRN-CM and mDMEM + 0.01 mM β -mercaptoethanol + 50% NBRN CM. As control, cells was cultured with mDMEM + 10% newborn calf serum (NBCS). The addition of NBRN CM into culture medium resulted in 12.97% newborn cells in fibroblast culture medium passage I. Newborn rat neuron conditioned medium in fibroblast culture medium resulted 12.97% neuron cells at passage 1. The percentage was increased (14.60%) when β -mercaptoethanol added into medium. The same result was found at passage 3 (12.67%; 13.17%). It showed that fibroblast cells has potency to transdifferentiated into neuron cells when cultured with NBRN CM. Further research is needed to know the fibroblast transdifferentiation potency.

Key words: fibroblast, transdifferentiation, *conditioned medium*, neuron cells, *in vitro*

PENDAHULUAN

Stem sel adalah sel yang terdapat dalam tubuh dan memiliki beberapa karakteristik seperti sel yang belum berdiferensiasi dan memiliki fungsi khusus. Berdasarkan sumbernya, *stem* sel dapat digolongkan menjadi *stem* sel embrionik dan *stem* sel dewasa. *Stem* sel embrionik terdapat pada *inner cell mass* (ICM) embrio tahap blastosis. *Stem* sel embrionik tersebut merupakan sel yang belum berdiferensiasi dan bersifat pluripoten karena sel-selnya mampu membentuk semua jaringan dan organ pada tubuh dewasa (Prentice, 2003). Penelitian eksplorasi pemanfaatan *stem* sel embrionik sebagai alternatif terapi sel terutama pada penyakit degeneratif telah banyak dilakukan, namun penggunaan *stem* sel embrionik tersebut memiliki kendala dalam bidang etika kedokteran terutama jika menggunakan *stem* sel yang berasal dari embrio manusia.

Stem sel dewasa merupakan sel yang belum berdiferensiasi yang terdapat pada jaringan, sel tersebut bersifat multipoten dan mempunyai kemampuan *self renewal* (Krause, 2002). *Stem* sel dewasa dapat ditemukan pada sumsum tulang, otak, darah tepi, gastrointestinal, folikel rambut, hati, pankreas, jantung,

kornea, retina, lemak, dan otot skeletal (Prentice, 2003). Sel tersebut berfungsi dalam memelihara dan memperbaiki kerusakan jaringan secara *in vivo*. Jika dibandingkan dengan *stem* sel embrionik, kemampuan berdiferensiasi *stem* sel dewasa lebih terbatas karena hanya mampu berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel saja serta hanya ditemukan dalam jumlah yang sedikit. *Mesenchymal stem cells* (MSCs) merupakan *stem* sel dewasa yang mempunyai morfologi seperti fibroblas (*fibroblast-like*) dan kemampuan diferensiasi MSCs menjadi beberapa jenis sel jaringan ikat sehingga menjadikan sel tersebut sebagai kandidat sumber sel dalam pengobatan regenerasi jaringan (Trzaska *et al.*, 2008). Terapi sel merupakan pengobatan dengan menggunakan sel dari tubuhnya sendiri. Hal tersebut diharapkan dapat mengobati beberapa penyakit seperti Parkinson, diabetes, dan penyakit jantung (Burke dan Tosh, 2005). Pengobatan secara seluler telah banyak dilakukan untuk degenerasi sel saraf, trauma kerusakan otak, dan lainnya (Lindvall *et al.*, 2004). Penelitian Efendi (2009) menunjukkan bahwa dari hasil kultur *bone marrow* tikus dapat ditemukan morfologi sel yang tumbuh yaitu *mesenchymal cell-like* dan *fibroblast cell-like*, serta sel

yang lainnya seperti hematositoblas, osteoblas, dan khondroblas serta progenitor sel saraf.

Penggunaan *stem* sel dewasa dapat dijadikan sebagai alternatif untuk mengatasi kendala penggunaan *stem* sel embrionik pada manusia. Beberapa penelitian yang menyatakan bahwa *stem* sel dewasa mampu melakukan transdiferensiasi. Transdiferensiasi merupakan manifestasi sifat plastisitas sel baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Wlodarski *et al.*, 2006). Tseng *et al.* (2007) melaporkan bahwa kultur primer *bone marrow stromal cells* dari tikus dewasa dapat berdiferensiasi secara spontan menjadi prekursor sel saraf setelah periode kultur yang lama (6 minggu). *Mesenchymal stem cells* juga dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondroblas, dan adiposit ketika MSCs diberi stimulus baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Krause, 2002). Dominici *et al.* (2001) menyatakan bahwa baik MSCs hewan maupun manusia dapat berdiferensiasi menjadi sel saraf ketika sel tersebut dikultur dalam medium yang mengandung bFGF, β -merkaptotanol, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), dan *butylated hydroxyanisole*. Penggunaan *conditioned medium* yang dikoleksi dari kultur sel saraf tikus yang baru lahir (*Primary culture of newborn rat neuron conditioned medium*, NBRN CM) dan β -merkaptotanol dalam kultur *bone marrow stromal cells* menghasilkan 90 dan 73,3% sel dengan morfologi seperti sel saraf (*neuron cells-like*) (Djuwita *et al.*, 2010). Zurita *et al.* (2005) menyatakan bahwa kultur *bone marrow stromal cells* dengan sel Schwann glia dapat menyebabkan sel-sel tersebut berdiferensiasi menjadi sel saraf.

Penelitian yang dilakukan untuk menguji adanya transdiferensiasi menunjukkan bahwa *stem* sel mesenkimial mampu berdiferensiasi menjadi sel saraf atau *stem* sel hematopoietik yang berdiferensiasi menjadi sel jantung. Oleh karena itu, maka harapan penggunaan *stem* sel dewasa sebagai terapi alternatif penyakit degeneratif menjadi lebih besar. Beberapa *cell line* fibroblas seperti 3T3 dapat menghasilkan kolagen tipe I dan III yang disekresikan pada medium kultur (Freshney, 2005). Sel fibroblas juga dapat menyekresikan beberapa faktor pertumbuhan (*growth factor*) lainnya di antaranya *fibroblast growth factor* (FGF) yang dapat menghambat diferensiasi, oleh karena itu kultur *stem* sel embrionik biasa menggunakan *mouse embryonic fibroblast feeder* (MEF) untuk menghambat *stem* sel berdiferensiasi sehingga pluripotensi *stem* sel dapat bertahan. Hakelien *et al.* (2002) melakukan kultur sel fibroblas 293T menggunakan ekstrak prekursor sel saraf dan menemukan adanya protein neurofilamen dan pertumbuhan sel seperti neurite (*neurite-like*). *Fibroblast cell-like* pada kultur *bone marrow* yang mampu berdiferensiasi menjadi sel neuron ketika dikultur dalam *conditioned medium* (CM) sel neuron (Djuwita *et al.*, 2010). Beberapa faktor pertumbuhan dapat memengaruhi perkembangan neuron seperti aFGF, bFGF PDGF dan IL-1 telah dibuktikan oleh Engele dan Bohn (1991) yang mendukung dalam

proses diferensiasi dan ketahanan hidup neuron. Untergasser *et al.* (2005) memperoleh hasil bahwa fibroblas yang berasal dari prostat manusia dipengaruhi oleh TGF sehingga dapat berubah menjadi miofibroblas. Berdasarkan hasil-hasil tersebut, maka ingin diketahui kemampuan sel fibroblas dari kulit yang merupakan sumber fibroblas jika diperlakukan dengan CM sel saraf. Tujuan penelitian ini adalah melakukan pengujian potensi sel fibroblas untuk mengalami transdiferensiasi menjadi sel saraf seperti yang ditemukan pada *fibroblast cell-like* kultur *bone marrow* dengan melakukan kultur sel fibroblas menggunakan *conditioned medium* kultur sel saraf.

MATERI DAN METODE

Isolasi dan Pembuatan *Conditioned Medium* Sel Saraf (NBRN CM)

Suspensi sel saraf dikoleksi dari otak anak tikus yang baru lahir (umur 3-4 hari) yang telah dieutanasia dengan eter. Otak bagian cerebrum kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri dan dicuci dengan medium *phosphate buffered saline* (PBS, tanpa Ca dan Mg). Setelah itu dilakukan pembilasan dengan medium PBS yang ditambah dengan *newborn calf serum* (NBCS) 0,1% menggunakan *syringe* 1 ml dengan jarum 26 G. Bilasan ditampung dalam cawan petri steril kemudian dihomogenkan dengan mikropipet 1000 μ l. Setelah homogen, suspensi kemudian dimasukkan ke dalam tabung 15 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 200 g selama 10 menit. Setelah supernatan dibuang, pelet diresuspensi dengan 4 ml medium PBS serum dan disentrifugasi ulang. Pencucian pelet sel dilakukan sebanyak empat kali, 3 kali menggunakan medium PBS serum dan 1 kali menggunakan medium *Dulbecco's modified eagle medium* (mDMEM). Terakhir, pelet sel diresuspensi dengan 1 ml medium mDMEM yang ditambah NBCS 10%.

Suspensi sel otak dengan konsentrasi sekitar 1×10^6 sel/ml kemudian dikultur dengan medium mDMEM yang ditambah NBCS 10% dan merkaptotanol 0,01 mM di dalam cawan petri dan kemudian dikultur di dalam inkubator dengan kondisi lingkungan suhu 37° C dan kadar CO₂ 5%. Penggantian medium dilakukan setiap 48-72 jam. Setelah kultur mencapai kondisi konfluen, dilakukan penggantian medium dengan mDMEM tanpa serum dan merkaptotanol. Koleksi NBRN CM dilakukan setelah 48 jam penggantian medium. Sebelum digunakan sebagai *conditioned medium* pada kultur sel fibroblas, medium yang dikoleksi tersebut disterilisasi dengan *millipore* filter 0,20 μ m.

Isolasi dan Kultur Sel Fibroblas

Sel fibroblas diisolasi dari jaringan otot fetus tikus umur kebuntingan 13-14 hari. Jaringan yang terkoleksi kemudian dicuci dalam medium PBS sampai bersih dari darah. Kemudian jaringan dihaluskan dengan menggunakan skalpel atau gunting bedah kecil yang

steril di dalam cawan petri steril berisi medium PBS mengandung tripsin 0,25% dalam waktu secepat mungkin. Jaringan kemudian didisosiasi dalam medium PBS yang mengandung tripsin di dalam wadah *beaker glass* dengan menggunakan *magnetic stirer* selama 30 menit. Suspensi yang diperoleh kemudian dikoleksi dan ditambah dengan medium PBS yang mengandung NBCS 0,1%. Setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 200 g selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang dan endapan sel dire suspensi kembali dengan medium PBS serum. Pencucian sel dilakukan dengan menggunakan medium PBS serum sebanyak 3 kali dan kemudian dengan medium mDMEM sebanyak 1 kali. Terakhir, endapan sel dire suspensi dengan 1 ml medium kultur mDMEM yang mengandung NBCS 10%.

Penghitungan konsentrasi sel dilakukan dengan menggunakan haemositometer Neubauer. Konsentrasi sel yang digunakan untuk *monolayer* adalah 500.000 sampai 600.000 sel/ml. *Plating* sel untuk kultur dilakukan di dalam *laminar air flow*. Kultur primer yang telah mencapai tahap konfluen 80-90% kemudian dipasase (subkultur) untuk mendapatkan kultur galur sel (*cell line*) fibroblas. Setiap pasase dilakukan pengamatan data konsentrasi dan setelah dilakukan penghitungan konsentrasi, sel kemudian dikultur di dalam cawan petri yang berisi medium kultur mDMEM yang mengandung NBCS 10%. Selain itu, salah satu cawan petri diberi *cover glass* steril untuk pewarnaan sebelum pengamatan morfologi sel.

Pertumbuhan Sel Fibroblas

Untuk mengetahui terjadinya proliferasi sel, sebelum dan setelah kultur baik pada kultur primer maupun setelah pasase, dilakukan penghitungan jumlah sel menggunakan hemositometer Neubauer dengan perhitungan sebagai berikut:

Total sel = jumlah sel pada 5 kotak x faktor pengenceran x 10^4 (sel/ml)

Population doubling time (PDT) kultur sel fibroblas dihitung menggunakan rumus:

$$\text{PDT (hari)} = \frac{1}{\frac{(\log \text{jumlah sel akhir} - \log \text{jumlah sel awal}) \times 3,32}{\text{waktu}}}$$

Pengujian Potensi Transdiferensiasi Sel Fibroblas Menjadi Sel Saraf

Suspensi sel fibroblas dikultur di dalam petri dengan 3 kelompok perlakuan medium yaitu: mDMEM + β -merkaptotanol 0,01mM; mDMEM + NBRN CM 50%; dan mDMEM + β -merkaptotanol 0,01mM + NBRN CM 50%. Sebagai kontrol dilakukan kultur dengan menggunakan media mDMEM yang ditambah NBCS 10%. Penggantian medium dilakukan setiap 48 jam sampai kultur sel mencapai konfluen. Pengamatan dan penghitungan sel dilakukan setelah dikultur selama enam hari. Pewarnaan terhadap preparat kultur sel dilakukan untuk mendeteksi sel saraf yang terdapat

dalam masing-masing perlakuan. Fiksasi preparat kultur sel dilakukan dengan menggunakan bufer fosfat 4% selama 24 jam, kemudian dengan alkohol 70% selama minimal 24 jam. Setelah itu dilakukan pewarnaan menggunakan *tolouidin blue*. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran objektif 40X.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Sel Fibroblas Dalam Kultur *In Vitro*

Hasil penghitungan jumlah sel fibroblas memperlihatkan terjadinya peningkatan jumlah sel pada kultur primer maupun pada kultur sel setelah mengalami pasase. Dilihat dari *population doubling time* (PDT), tampak bahwa PDT pada kultur primer lebih tinggi dibandingkan dengan pasase ke-1, tetapi selanjutnya meningkat sampai pasase 3 dan kembali menurun pada pasase 4 (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah dan dari *population doubling time* (PDT) sel fibroblas pada kultur *in vitro*

Galur sel	Jumlah sel (10^3)		PDT (hari)
	Awal	Akhir	
Kultur primer	4,5	82,6	2,1
Galur sel 1	1,4	15,7	1,8
Galur sel 2	6,4	53,2	2,6
Galur sel 3	5,3	21	2,9
Galur sel 4	1,4	16	1,7

Doubling time adalah periode waktu yang diperlukan oleh sel untuk menjadikan jumlah atau ukurannya dua kali dari jumlah maupun ukuran semula (Mader, 2000). Semakin cepat proses proliferasi (pembelahan) sel, maka PDT yang dicapai pun akan semakin cepat. Nilai PDT pada kultur primer adalah 2,1 yang menunjukkan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk proses pembelahan sel selama 2,1 hari. Waktu ini lebih lama jika dibandingkan dengan waktu yang dibutuhkan untuk proses pembelahan sel secara *in vivo* yaitu berkisar 18-24 jam (Butler, 2004). *Population doubling time* juga menunjukkan homogenitas sel yang dikultur, sel yang telah mengalami beberapa kali pasase akan semakin homogen dan mempunyai kemampuan beradaptasi dengan kondisi lingkungan *in vitro* dengan lebih baik. Menurut Freshney (2005) setelah kultur dipasase tiga kali, maka sel-sel yang dikultur akan menjadi lebih stabil dan mempunyai kemampuan berproliferasi lebih cepat. Semakin homogen sel di dalam kultur, maka tingkat proliferasinya juga akan semakin cepat. Hal tersebut tampak karena mulai pasase ke-4 menunjukkan nilai PDT yang lebih kecil yaitu 1,7 dan hal tersebut menunjukkan semakin homogen sel fibroblas yang dikultur pada penelitian ini.

Pengujian Potensi Transdiferensiasi Sel Fibroblas Menjadi Sel Saraf *In Vitro*

Hasil pengujian untuk mengetahui potensi transdiferensiasi sel fibroblas dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji potensi transdiferensiasi sel fibroblas dengan beberapa media untuk pengarahannya menjadi sel saraf setelah perlakuan selama 6 hari

Perlakuan media	Rata-rata persentase sel saraf	
	Pasase ke-1	Pasase ke-3
mDMEM serum (kontrol)	0,70±0,43 ^a	0,16±0,15 ^c
mDMEM + β-merkaptotanol 0,01mM	11,90±0,46 ^b	11,53±0,85 ^d
mDMEM + NBRN CM 50%	12,97±1,20 ^b	12,67±0,47 ^d
mDMEM + β-merkaptotanol +NBRN CM	14,60±1,17 ^b	13,17±0,63 ^d

^{a, b, c, d}Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kontrol dengan uji statistik T-test

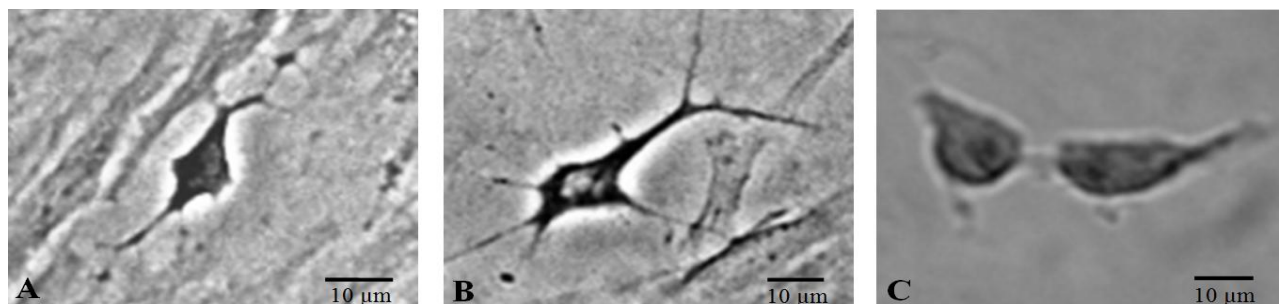
Pada Tabel 2 dapat dilihat, bahwa baik pada medium perlakuan maupun kontrol ditemukan adanya sel saraf pada kultur sel fibroblas. Pada kultur sel fibroblas dengan media mDMEM yang ditambah serum (kelompok kontrol) terdapat sel saraf dengan jumlah sebesar 0,7% pada pasase pertama dan 0,16% pada pasase ketiga. Tampaknya sel saraf tersebut berasal dari progenitor sel saraf yang terambil pada saat koleksi sel fibroblas dari jaringan otot fetus tikus. Persentase yang menurun pada pasase ketiga kemungkinan karena berkurangnya progenitor sel saraf seiring dengan meningkatnya homogenitas sel fibroblas.

Perlakuan kultur sel fibroblas dengan medium yang mengandung β-merkaptotanol 0,01mM; NBRN CM 50% dan campuran keduanya meningkatkan persentase ditemukannya sel saraf yang nyata secara statistik dibandingkan dengan kontrol, baik pada pasase pertama (11,90; 12,97; dan 14,60%) maupun pasase ketiga (11,53; 12,67; dan 13,17%).

Perlakuan dengan menggunakan medium yang dapat mengarahkan *stem* sel dari sel sumsum tulang menjadi sel saraf yaitu β-merkaptotanol 0,01 mM dan NBRN CM 50% serta gabungan kedua media tersebut, dapat meningkatkan persentase sel saraf dalam kultur sel fibroblas baik pada pasase pertama maupun ketiga. Penambahan NBRN CM 50% dalam media kultur menghasilkan persentase sel saraf yang lebih tinggi baik pada pasase pertama dan ketiga (12,97%; 12,67%) dibandingkan dengan penambahan merkaptotanol 0,01 mM (11,90%; 11,53%). Sedangkan penggabungan kedua media tersebut dapat meningkatkan persentase sel saraf yang ditemukan dalam kultur jika dibandingkan penggunaan secara sendiri-sendiri (14,60%; 13,17%). *Conditioned medium* yang diperoleh dari media kultur

sel saraf tanpa serum diperkirakan banyak mengandung *growth factor*, terutama *neuron growth factor* (NGF) yang disekresikan oleh sel saraf di dalam kultur yang mampu mengarahkan sel fibroblas berdiferensiasi menjadi sel saraf. Kultur sel MSC dari sumsum tulang tikus menggunakan *conditioned medium* kultur sel glia mesencephalic menghasilkan morfologi sel berbentuk *spindle* dan ada juga yang bipolar (Guo *et al.*, 2005). Persentase sel saraf sebesar 90% ditemukan pada kultur *stem* sel sumsum tulang tikus yang dikultur dalam NBRN CM 50% setelah seminggu perlakuan (Djuwita *et al.*, 2010). Kitazawa dan Shimizu (2005) menyatakan bahwa penambahan sebanyak 5% *dorsal root ganglion conditioned medium* (DRG-CM) efektif menginduksi diferensiasi *stem* sel embrionik mencit menjadi neuron. Pada penelitian ini, pemberian NBRN CM 50% juga dapat mengarahkan sel fibroblas menjadi sel saraf dalam persentase yang lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan *stem* sel dari sumsum tulang. Perubahan/transdiferensiasi sel ini terjadi karena adanya pengaruh lingkungan mikro (Trzaska *et al.*, 2008) pada medium kultur sel tersebut.

Penggunaan *stem* sel mesenkimal (*mesenchymal stem cells*, MSCs) yang berasal dari jaringan dewasa pada saat ini menjanjikan sebagai sumber sel yang berpotensi pada pengobatan penyakit degeneratif seperti penyakit yang berhubungan dengan sel saraf. Pada umumnya MSC yang berasal dari jaringan dewasa memperlihatkan morfologi sel *fibroblast-like* (Baksh *et al.*, 2004). Penelitian pengarahannya diferensiasi MSC yang berasal sumsum tulang (*bone marrow*) menjadi sel saraf telah banyak dilakukan. Sel-sel MSC yang diperoleh dari sumsum tulang manusia, tikus, dan mencit dapat menghasilkan beberapa jenis sel saraf sehingga dapat digunakan untuk terapi pada beberapa penyakit yang berhubungan dengan sel saraf. Proses tersebut disebut transdiferensiasi atau plastisitas sel MSC (Halim *et al.*, 2010). Penggunaan beberapa bahan kimia seperti DMSO, β-merkaptotanol dapat digunakan untuk menginduksi transdiferensiasi MSC menjadi sel saraf (Trzaska *et al.*, 2008). Hasil penelitian Djuwita *et al.* (2010) menunjukkan persentase sel saraf sebesar 73,3% pada kultur *stem* sel sumsum tulang yang dikultur dengan medium DMEM yang ditambah dengan merkaptotanol. Pada penelitian ini, tampak bahwa merkaptotanol juga dapat menginduksi sel fibroblas menjadi sel saraf dengan persentase yang rendah.

**Gambar 1.** Sel saraf yang ditemukan pada kultur fibroblas (A= Bipolar, B= Multipolar, C= Progenitor sel saraf, bar: 10 µm)

Morfologi sel saraf yang ditemukan pada kultur fibroblas dengan NBRN CM 50% dan merkaptopetanol adalah sel saraf berbentuk bipolar dan multipolar (Gambar 1a dan b). Pada kelompok kontrol ditemukan progenitor sel saraf (Gambar 1 c), sehingga sel saraf yang dapat tumbuh dalam kultur tersebut diduga berasal progenitor sel saraf tersebut.

Vierbuchen *et al.* (2010) menyatakan bahwa ekspresi faktor Ascl1, Brn2, dan Myt11 dapat mengkonversi *mouse embryonic fibroblast* (MEF) dan fibroblas pascalahir menjadi neuron fungsional. Hal serupa terjadi pada kultur fibroblas yang berasal dari sampel fibroblas manusia dan ditandai dengan adanya perubahan *marker* kolagen (Pfisterer *et al.*, 2011). Oh *et al.* (2014) melakukan reprogram sel fibroblas embrionik mencit secara langsung menggunakan kombinasi faktor transkripsi Ascl1 dan Nurr1 serta beberapa faktor neurotropik di dalam sistem kultur yang terkondisi sehingga pendekatan ini dapat digunakan untuk memperoleh sumber sel pada terapi penyakit Parkinson.

KESIMPULAN

Induksi kultur sel fibroblas dengan NBRN CM 50% menyebabkan ditemukan sel dengan morfologi sel saraf dalam persentase 12,97% pada pasase ke-1 dan 12,67% pada pasase ke-3. Penambahan β -merkaptopetanol dapat meningkatkan sel saraf yang ditemukan. Penggunaan NBRN CM berpotensi untuk mengarahkan sel fibroblas menjadi sel saraf secara *in vitro* (transdiferensiasi).

DAFTAR PUSTAKA

- Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan. 2004. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol.* 8(3):301-316.
- Burke, Z.D. and D. Tosh. 2005. Therapeutic potential of transdifferentiated cells. *Clin. Sci.* 108:309-321.
- Butler, M. 2004. *Animal Cell Culture & Technology*. 2nd ed. Bios Scientific Publisher, Taylor & Francis Group, London.
- Djuwita, I., K. Mohamad, W.E. Prasetyaningtyas, dan Nurhidayat. 2010. In vitro differentiation of adult rat bone marrow stromal cells into neurons using conditioned medium of newborn rat neuron primary culture. *The Proceedings of the first Congress of SEAVSA*. Bogor:51-52.
- Dominici, M., T.J. Hofmann, and E.M. Horwitz. 2001. Bone marrow mesenchymal cells: Biological properties and clinical applications. *J. Biol. Regulators Homeostatic Agents*. 15:28-37.
- Efendi, A. 2009. Pengaruh *Conditioned Medium Rat Embryonic Fibroblast* (CM-REF) dengan dan Tanpa *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) dalam Medium terhadap Tingkat Proliferasi dan Sifat Pluripotensi *Mesenchymal Stem Cell* Sumsum Tulang Tikus dalam Kultur *In Vitro*. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Engel, J. and M.C. Bohn. 1991. The neurotrophic effect of fibroblast growth factor on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia. *The J. Neurosci.* 11(10):3070-3078.
- Freshney, R.I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th ed. John Wiley & Sons. Inc., New York.
- Guo, L., F. Yin, H.Q. Meng, L. Ling, T.N. Hu-he, P. Li, C.X. Zhang, S. Yu, D.S. Duan, and H.X. Fan. 2005. Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro. *Biomed. and Environ. Sci.* 18:36-42.
- Hakelien, A.M., H.B. Landsverk, J.M. Robl, B.S. Skalhegg, and P. Collas. 2002. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nature Biotech.* 20:460-466.
- Halim, D., H. Murti, F. Sandra, A. Boediono, Djuwantono, dan B. Setiawan. 2010. *Stem Cell. Dasar Teori dan Aplikasi Klinis*. Erlangga, Jakarta.
- Kitazawa, A. and N. Shimizu. 2005. Differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia. *J. Biosci. Bioengineering*. 100(1):94-99.
- Krause, D.S. 2002. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Therapy*. 9:754-758.
- Lindvall, O., Z. Kokaia, and Martinez-Serrano. 2004. A stem cell therapy for human neurodegenerative disorder- how to make it work. *Nat. Med.* 10:S42-S50.
- Mader, S.S. 2000. *Human Biology*. McGraw Hill, Iowa.
- Oh, S., H.-s. Park, I. Hwang, H.-k. Park, K. Choi, H. Jeong, S.W. Kim, and S. Hong. 2014. Efficient reprogramming of mouse fibroblast to neuronal cells including dopaminergic neurons. *The Sci. World Journal*. 2014:1-8.
- Pfisterer, U., A. Kirkerby, O. Torper, J. Wood, J. Nelander, A. Dufour, Bjorklund, O. Lindvall, J. Jakobsson, and M. Parmar. 2011. Direct conversion of human fibroblast to dopaminergic neurons. *PNAS*. 108 (25):10343-10348.
- Prentice, D.A. 2003. *Stem Cells and Cloning*. Pearson Education Inc. San Francisco.
- Trzaska, K.A., M.D. Castillo, and P. Rameshwar. 2008. Adult mesenchymal stem cells in neural regeneration and repair: Current advances and future prospects (review). *Molec. Med. Report*. 1:307-316.
- Tseng, P.Y., C.J. Chen, C.C. Sheu, C.W. Yu, and Y.S. Huang. 2007. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long term culture. *J. Vet. Med. Sci.* 69(2):95-102.
- Untergasser, G., R. Gander, C. Lilg, C. Lepperdinger, E. Plas, and P. Berger. 2005. Profiling molecular target of TGF-beta 1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Mech Ageing Dev.* 126:59-69.
- Vierbuchen, T., A. Ostermeier, Z.P. Pang, Y. Kokubu, T.C. Sudhof, and M. Wernig. 2010. Direct conversion of fibroblast to functional neurons by defined factor. *Nature*. 463:1035-1042.
- Wlodarski, K.H., P.K. Wlodarski, and A. Brodzikowska. 2006. Metaplasia of chondrocytes into osteoblast. *Folia Biologica*. 54:3-4.
- Zurita, M., J. Va Queor, S. Oya, and M. Miguel. 2005. Schwann cells induce neuronal differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport*. 16:505-508.