

Pertumbuhan dan Sekresi Protein Hasil Kultur Primer Sel-Sel Serebrum Anak Tikus

(*IN VITRO GROWTH AND PROTEIN SECRETION OF NEWBORN RAT CEREBRAL PRIMARY CELLS CULTURE*)

Ita Djuwita^{1*}, Vivit Riyacumala², Kusdiantoro Mohamad,
Wahono Esthi Prasetyaningtjas¹, Nurhidayat¹

¹Lab Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,

²Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan,

Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus IPB Bogor 16680

Jalan Agatis Kampus IPB Bogor 16680

*Koresponden: E-mail: djuwitawiryadi@yahoo.com;

Telp/Fax: 0251-8421823/0251-8629464

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian terhadap pertumbuhan dan sekresi protein hasil kultur primer sel-sel serebrum anak tikus (*Sprague Dawley*) dalam medium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang diberi tambahan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, asam amino non esensial (NEAA) 10%, 3mM NaHCO₃, 50 µg/mL gentamycin (mDMEM) dengan dan tanpa insulin transferin selenium (ITS1) µl/mL (yang mengandung insulin 5mg/ml, transferin 10mg/ml, dan selenium 5mg/ml; Sigma St Louis USA). Kultur dilakukan dalam inkubator CO₂ 5%, pada suhu 37° C sampai dengan 90% konfluen. Identifikasi dilakukan terhadap proliferasi sel dan *population doubling time* (PDT), jumlah sel saraf (neuron) dan glia, panjang akson dan dendrit serta sekresi protein. Jumlah dan panjang neuron dihitung masing-masing menggunakan hemositometer dan *eyepiece micrometer*. Protein yang disekresikan ke dalam medium kultur disebut sebagai *conditioned medium* (CM) dianalisis menggunakan metode *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Data-data kuantitatif dianalisa menggunakan statistik T-test pada program Minitab. Hasil kultur *in vitro* sel-sel serebrum menunjukkan ada dua tipe sel meliputi neuron bipolar dan multipolar, serta sel-sel glial yakni astrosit (fibrous dan protoplasmik), oligodendrosit, dan mikroglia. Suplementasi ITS ke dalam medium kultur meningkatkan proliferasi sel serebrum (P<0.05) dengan PDT yang lebih rendah, dan secara kualitatif konsentrasi protein 30kDa yang lebih tinggi yang diindikasikan dari pita protein yang lebih tebal.

Kata-kata kunci: proliferasi, sekresi protein, sel-sel neuronal, kultur *in vitro*

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the proliferation and differentiation of mice cerebrum cells and its protein product. Research has been conducted on *in vitro* growth of three days old rat cerebrum cells in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) containing 10% Amino Acid Non Essential (AANE), 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 3mM NaHCO₃, 50 mg/ml gentamycin, and supplemented with and without 5 mg/ml insulin, 10 mg/ml transferin, 5 mg/ml selenium (ITS). Culture was done in 5% CO₂, then incubated at 37°C until 90% confluent. Identification were done on cell proliferation and population doubling time (PDT), number of neuron and glial cells, length of axon and dendrit, and protein secretion. The number and length of neuronal cells were calculated by using hemocytometer and eyepiece micrometer, respectively. Protein secreted into culture medium, designed as conditioned medium (CM) was analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. Quantitative data were analyzed using statistical T-test on Minitab program. *In vitro* culture of rat cerebrum cells showed two types of cells including nerve cells of bipolar and multipolar neurons and glial cells including astrocyte (the fibrous and protoplasmic), oligodendrocyte, and microglia. Supplementation of ITS into the culture medium increased the cell proliferation rate (P<0.05) with lower PDT, and quantitatively, the 30 kDa secreted protein as indicated by the higher intensity of the protein band.

Keywords: proliferation, protein secretion, neuronal cells, *in vitro* culture

PENDAHULUAN

Otak merupakan organ tubuh yang sangat penting yang memiliki fungsi antara lain untuk mengontrol dan mengkoordinasi semua aktivitas normal tubuh serta berperan dalam penyimpanan memori. Jaringan otak memiliki sel utama yakni sel saraf (neuron) yang berfungsi untuk menyampaikan sinyal dari satu sel ke sel lainnya, serta sel-sel glia yang berfungsi untuk melindungi, mendukung, merawat, serta mempertahankan homeostasis cairan di sekeliling neuron.

Jaringan otak sistem saraf pusat (SSP) sangat peka terhadap berbagai cedera seperti trauma mekanik, ischemia, dan stres oksidatif (Lee *et al.*, 2002). Baik cedera SSP maupun penyakit neurodegeneratif dapat mengakibatkan berbagai tingkat kematian neuron dan neuroinflamasi serta kelemahan memori (Colville dan Bassert, 2002; Jackson *et al.*, 2010). Selama lebih dari satu dekade diyakini bahwa jaringan otak yang mengalami kerusakan tidak dapat mengalami regenerasi (Horner *et al.*, 2000); karenanya kerusakan pada SSP dapat bersifat permanen (Yiu dan He, 2006). Namun kemudian, diketahui bahwa di dalam jaringan SSP masih terdapat populasi *neural stem cells* (NSCs) ataupun *neural progenitor cells* (NPCs) (Gage, 2000; Cao *et al.*, 2002). Secara *in vivo* dan *in vitro* telah dibuktikan bahwa NSCs atau NPCs memiliki kemampuan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi neuron dan glia bahkan memperbaiki kondisi jaringan otak yang rusak (Renolds dan Weiss, 1992; Gould dan Tanapat, 1997; Zhang *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002; Gage, 2000; Taupin dan Gage, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Huang dan Huang, 2006; Ma *et al.*, 2006). Bahkan Goldman (2004) melaporkan bahwa proses neurogenesis dan gliogenesis tetap berlangsung pada beberapa daerah otak dewasa, namun kemampuan regenerasi tersebut sangat terbatas.

Upaya untuk meningkatkan proses neurogenesis dan gliogenesis baik secara *in vivo* maupun *in vitro* telah dilakukan melalui induksi *in vivo* ataupun penambahan dalam medium kultur *in vitro* beberapa komponen di antaranya *epidermal growth factor* (EGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Ohori *et al.*, 2006), *transforming growth factor-alpha* (TGF- α), dan *insulin growth factor* (IGF-1) (Renold dan Weiss, 1992; Cameron *et al.*, 1998; Guerra-Crespo *et al.*, 2009). Khususnya IGF-I dan IGF-II diketahui memiliki daya mitogen dan sebagai

survival factor sel-sel neuronal yang kuat (Sullivan *et al.*, 2008).

Ke dalam sistem kultur *in vitro* seringkali diberi tambahan *insulin transferin selenium* (ITS) karena diketahui mampu meningkatkan daya hidup dan proliferasi sel (Freshney, 1994). Beberapa penelitian menggunakan sistem kultur menunjukkan bahwa beberapa pengaturan fungsi neuronal terjadi melalui sinyal reseptor insulin pada sel-sel neuronal. Insulin memiliki efek mitogenik karena pada sel neuronal terdapat reseptor terhadap insulin yaitu *insulin-like growth factor receptor* (reseptor IGF-1) (Choi *et al.*, 2005; Govind *et al.*, 2001). Tujuan penelitian ini adalah menguji kemampuan proliferasi dan diferensiasi sel-sel serebrum otak anak tikus secara *in vitro* menggunakan medium kultur yang diberi tambahan ITS serta menganalisis sekreta protein yang dihasilkan dalam medium kultur.

METODE PENELITIAN

Isolasi Sel-Sel Serebrum

Tikus *strain Sprague Dawley* umur tiga hari dikorbankan nyawanya terlebih dahulu dengan menggunakan eter, kemudian daerah kepala didesinfeksi dengan alkohol 70%. Otak bagian serebrum diisolasi dan dicuci dengan larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 0.5% dan gentamycin 50 mg/ml (selanjutnya disingkat mPBS). Suspensi otak dibuat dengan cara menyedot dan mengeluarkan kembali secara berulang menggunakan spuit 1 cc yang mengandung larutan mPBS. Suspensi dimasukkan ke dalam tabung dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 210 g selama 10 menit. Pencucian dilakukan dengan mPBS sebanyak empat kali ulangan dan medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) yang diberi tambahan asam amino non esensial (AANE) 10%, FBS 10% dan gentamycin 50 g/ml (disingkat mDMEM) sebanyak satu kali ulangan. Terakhir pelet diresuspensi dalam larutan mDMEM sebanyak 1 ml.

Kultur Sel-Sel Serebrum

Suspensi otak dengan konsentrasi 9×10^4 sel/ml dikultur dalam cawan petri yang telah dilapisi dengan gelatin 0,1% dan berisi 2 ml mDMEM dengan dan tanpa 5 mg/ml insulin, 10 mg/ml transferin, 5 mg/ml selenium (ITS) Kultur sel otak untuk evaluasi menggunakan

pewarnaan, ditumbuhkan di atas *cover glass* yang telah dilapisi dengan gelatin 0,1%. Kultur sel otak dilakukan dengan teknik aseptis di dalam *clean bench* untuk mencegah kontaminasi. Kultur diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Penggantian medium dilakukan setiap dua hari untuk menyediakan kembali nutrisi yang berkurang dan membuang sisa metabolisme sel. Kultur dilakukan sampai 10 hari atau mencapai 90% konfluen.

Pembuatan dan Koleksi *Conditioned Medium* (CM)

Medium kultur primer dibuang dan dicuci dengan mPBS tanpa FBS. Selanjutnya diganti dengan mDMEM tanpa FBS pada masing-masing petri sebanyak 2 ml. Setelah dua hari medium dikoleksi (sebagai *conditioned medium*) dan disimpan dalam tabung eppendorf 1,5 ml dalam refrigerator untuk dianalisis protein lebih lanjut menggunakan metode *dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Evaluasi Hasil Kultur Sel-Sel Serebrum Tingkat Proliferasi dan *Population Doubling Time*

Tingkat proliferasi ditentukan berdasarkan penghitungan jumlah sel sebelum dan setelah kultur. Peningkatan (proliferasi) sel diketahui dari total sel yang tumbuh menggunakan kamar hitung hemositometer *Improved Neubauer* dengan perhitungan sebagai berikut: Total sel (sel /ml) = jumlah sel pada 5 kotak x faktor pengenceran x 10⁴.

Population Doubling Time adalah waktu yang diperlukan oleh populasi sel untuk menjadikan jumlahnya dua kali dari jumlah semula. *Population Doubling Time* (hari) dihitung menggunakan rumus: 1 per ((log jumlah sel akhir dikurangi log jumlah sel awal) x 3,32) per waktu kultur (Davis, 2011).

Diferensiasi Sel-Sel Serebrum

Jumlah Neuron dan Glia. Identifikasi tipe-tipe sel (neuron dan glia) yang tumbuh dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi baik secara natif maupun setelah sel diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Kultur sel yang ditumbuhkan di atas *cover glass* dicuci menggunakan PBS kemudian difiksasi dalam larutan bufer paraformaldehid 4% selama 24 jam. Sebelum pewarnaan HE preparat kultur sel direndam dalam alkohol 50% selama tiga

menit, kemudian direndam berturut-turut dalam aquades selama lima menit dan hematoksin empat menit, dan dibilas kembali dengan aquades. Selanjutnya direndam dalam eosin selama dua menit dan dibilas dengan aquades. Setelah pewarnaan, preparat kultur sel didehidrasi dalam alkohol bertingkat yakni 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut 3 kali ulangan, masing-masing 10 menit dan dilanjutkan dalam xilol dua kali ulangan, kemudian di *mounting* pada *object glass* menggunakan entelan. Evaluasi dilakukan dengan mengamati morfologi sel dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 40x10.

Pertumbuhan Panjang Akson dan Dendrit Neuron. Pertumbuhan panjang akson dan dendrit sel saraf diamati dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 40x10 dan diukur menggunakan *eyepiece* mikrometer. Jumlah sel yang diukur sebanyak 50 neuron untuk masing-masing ulangan.

Identifikasi Sekresi Protein Menggunakan SDS-PAGE

Larutan marka protein (sebagai berat molekul standar) dan sampel CM kultur sel serebrum masing-masing sebanyak 15 µl dicampurkan dengan *loading buffer* (1:2) dan dimasukkan ke dalam sumur gel poliakrilamid. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 120 V dan arus listrik sebesar 25 A selama 3 jam. Selanjutnya untuk visualisasi pita-pita protein dilakukan dengan pewarnaan perak nitrat.

Rancangan Percobaan

Kultur sel-sel serebrum dibagi menjadi dua kelompok perlakuan berdasarkan kondisi medium yang digunakan yaitu (1) mDMEM dan (2) mDMEM yang diberi tambahan ITS (insulin 5 mg/ml, transferin 10 mg/ml, selenium 5 mg/ml) masing-masing sebanyak tiga kali ulangan. Parameter yang diamati adalah tipe sel (neuron dan glia) yang tumbuh berdasarkan morfologi, tingkat proliferasi dan PDT, komposisi neuron dan sel glia, panjang akson dan dendrit sel saraf, serta kandungan protein yang disekresikan. Data kuantitatif yaitu tingkat proliferasi, PDT dan panjang akson-dendrit dianalisis menggunakan metoda statistik *T-test* dengan tingkat kepercayaan 95%; sedangkan data tipe-tipe sel dan gambaran protein yang disekresikan diuraikan secara deskriptif.

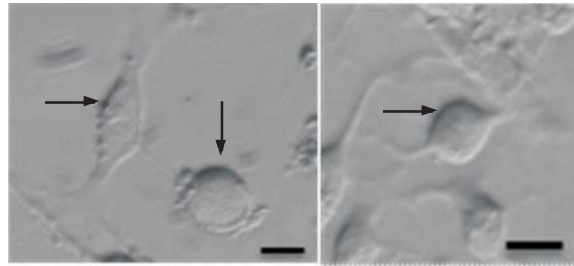
HASIL DAN PEMBAHASAN

Proliferasi dan *Population Doubling Time* (PDT)

Setelah kultur mencapai 90% konfluen, jumlah sel serebrum yang tumbuh dalam mDMEM dengan penambahan ITS ($(8,6 \pm 0,2) \times 10^5$) secara nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan dalam mDMEM tanpa ITS ($6,2 \pm 1,0 \times 10^5$). Demikian pula dengan PDT yang dihasilkan dalam mDMEM+ITS ($3,2 \pm 0,2\alpha$) lebih cepat dibandingkan dalam mDMEM tanpa penambahan ITS ($3,9 \pm 0,3$) (Tabel 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan ITS ke dalam medium kultur mampu meningkatkan proliferasi sel-sel serebrum. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian Erikson *et al.*, (2008) yang menunjukkan bahwa insulin dan transferin berperan dalam mempertahankan daya hidup dan proliferasi NPCs. Insulin memberikan pengaruh yang bersifat pleiotropik pada neuron seperti pengaturan proliferasi, apoptosis, dan transmisi sinaps, karenanya gangguan dalam metabolisme insulin pada SSP dapat menimbulkan gangguan pada fungsi SSP (Sabayan *et al.*, 2008).

Adanya transferin dan selenium juga membantu pertumbuhan sel menjadi lebih baik karena transferin diketahui sebagai protein pengangkut zat besi ke dalam sel serta dapat mengoptimalkan pertumbuhan sel melalui proses detoksifikasi terhadap peroksidase dan radikal bebas dalam medium. Selenium dalam medium digunakan sebagai antioksidan yang dapat mengoptimalkan pertumbuhan sel melalui aktivasi *glutathione peroxidase* yang berfungsi dalam detoksifikasi dari radikal bebas (Freshney, 1994).

Terjadinya proliferasi sel disebabkan pada jaringan serebrum masih terdapat neuronal progenitor cells (NPCs) yang memiliki kemampuan untuk proliferasi dan diferensiasi. Hasil pengamatan natif pada kultur primer sel-sel serebrum ditemukan progenitor neuron atau neuroblast yang memiliki morfologi bulat, dengan disertai penjurulan pendek (bipolar



Gambar 1 Morfologi neuroblast (tanda panah). Preparat natif. Bar: 10 μ m.

neuroblast), serta berbentuk spindel yang memanjang (Gambar 1). Neuroblast di dalam kultur berbentuk bulat, dan akan berkembang menjadi neuron dan penjurulan neuroblast pada akhirnya akan membentuk akson dan dendrit (Kalverbour *et al.*, 1999). Hal tersebut membuktikan bahwa walaupun sebagian besar neuron mamalia terbentuk pada masa prenatal, namun pada beberapa bagian otak terdapat progenitor neuron yang memiliki kemampuan untuk pertumbuhan neuron baru melalui proses neurogenesis. Seperti halnya neuron, sel glia berkembang dari neuroblas (Gage, 2000; Lee *et al.*, 2000).

Diferensiasi Neuron dan Glia

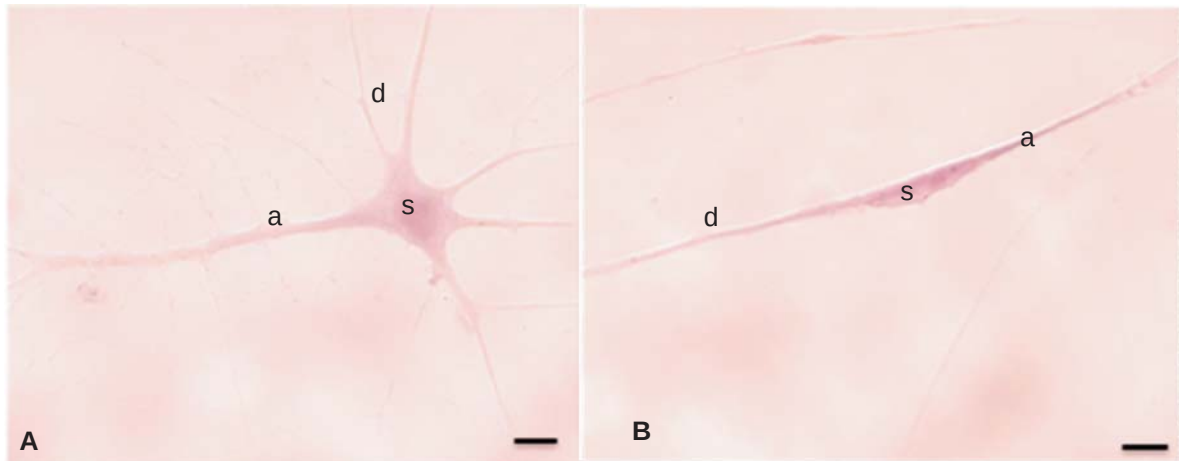
Sebagian besar sel yang tumbuh dan berkembang dalam kultur primer sel serebrum adalah neuron dan sel-sel glia. Neuron (bipolar dan multipolar) umumnya memiliki morfologi badan sel yang besar dengan penjurulan akson dan dendrit (Gambar 2). Sel saraf bipolar memiliki inti sel bulat dengan satu penjurulan akson dan satu penjurulan dendrit; sedangkan neuron multipolar memiliki morfologi inti sel besar dengan beberapa penjurulan dendrit dan satu penjurulan akson.

Sel-sel glia memiliki ukuran yang relatif lebih kecil dari neuron dan tampak memiliki inti sel yang lebih gelap karena mengandung banyak kromatin. Sel-sel glia yang tumbuh dalam kultur sel serebrum adalah astrosit,

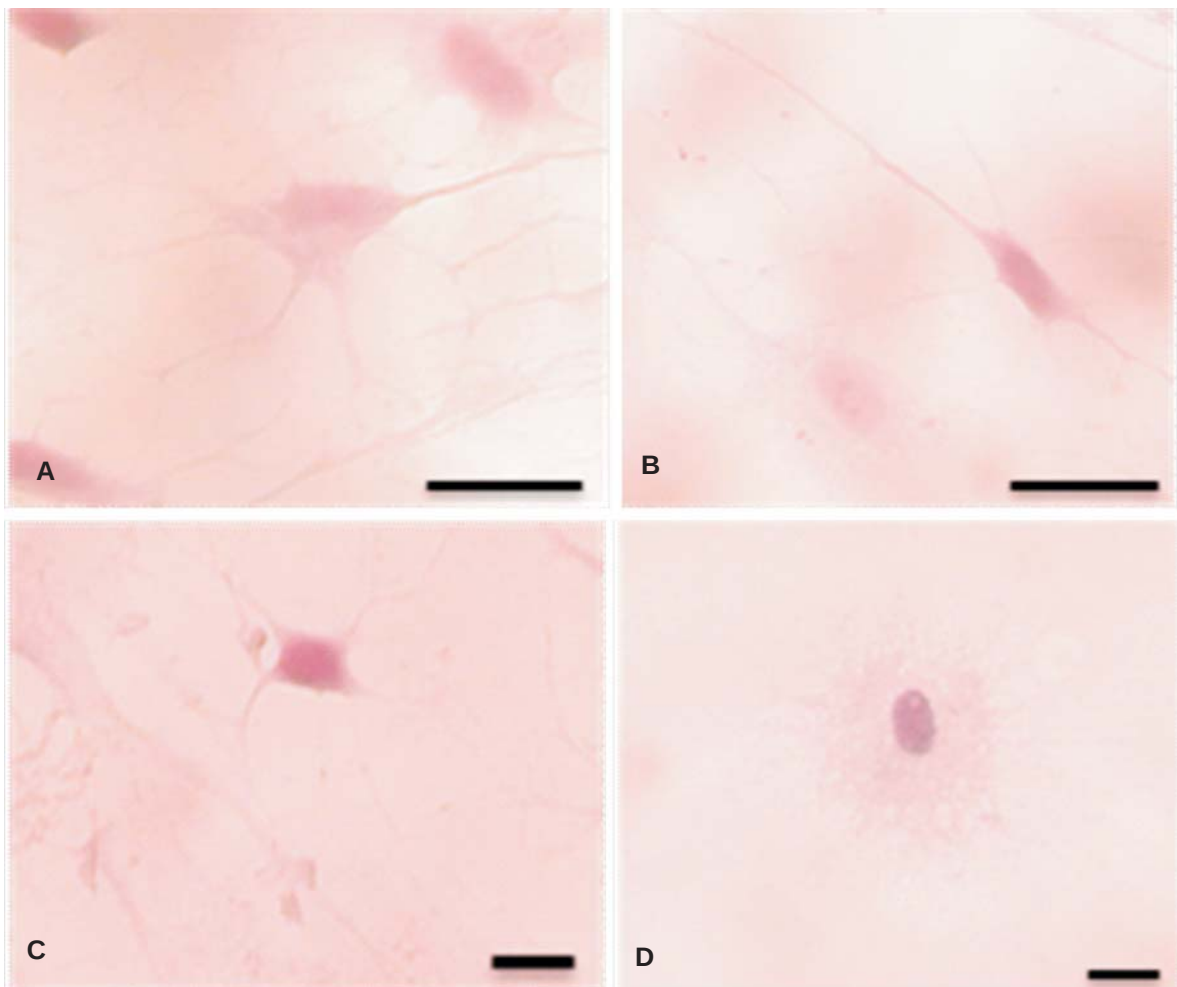
Tabel 1 Tingkat proliferasi sel serebrum yang tumbuh dalam medium mDMEM dan mDMEM+ITS

Jumlah awal	mDMEM		DMEM+ITS	
	Jumlah akhir	PDT	Jumlah akhir	PDT
$9,0 \times 10^4$	$6,2 \pm 1,0 (x10^5)^a$	$3,9 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,29 (x10^5)^b$	$3,2 \pm 0,2$

Huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).



Gambar 2 Morfologi neuron dalam kultur *in vitro*, a: akson, d: dendrit, s: badan sel. (A) Neuron multipolar. (B) Neuron bipolar. Pewarnaan HE. Bar: 10µm.



Gambar 3 Morfologi sel glia. (A) Astrosit protoplasmik. (B) Astrosit fibrous. (C) Oligodendrosit. (D) Mikroglia. Pewarnaan HE. Bar: 10µm.

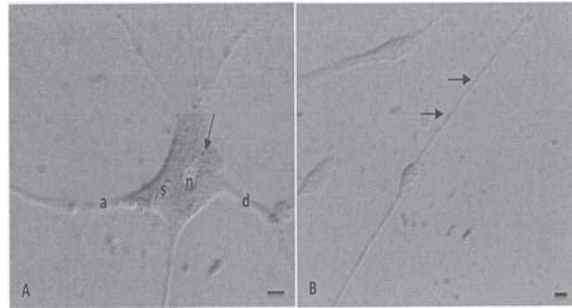
oligodendrosit, dan mikroglia (Gambar 3). Sel glia lainnya seperti sel Schwann dan sel ependymal tidak ditemukan, karena kedua tipe glia tersebut ditemukan di susunan saraf perifer. Hal tersebut selaras dengan Zhang (2001) bahwa pada SSP hanya terdapat tiga jenis sel glia yakni astrosit, oligodendrosit, dan mikroglia.

Astrosit memiliki morfologi yang khas dengan penjururan sitoplasma seperti bintang. Astrosit protoplasmik memiliki inti yang bulat berbeda dengan astrosit fibrous yang memiliki inti sedikit lebar dan memanjang. Astrosit berfungsi dalam memberi nutrisi neuron, mengontrol sinyal antar neuron, mengatur ion dan metabolisme neuron, serta sebagai *blood brain barrier* (Kettenmann dan Ransom, 1995) dan melalui sinap-sinap, astrosit berkomunikasi dengan neuron (Fields dan Stevens-Graham, 2002).

Oligodendrosit memiliki morfologi yang menyerupai astrosit dengan jumlah penjururan lebih sedikit dan kecil. Mikroglia memiliki inti sel kecil dan bulat dikelilingi dengan banyak penjururan berukuran kecil. Oligodendrosit berfungsi dalam sintesis selubung myelin sedangkan mikroglia berfungsi sebagai makrofag dalam jaringan saraf (Pfeiffer dan Warrington, 1993; Kettenman dan Ransom, 1995).

Neuron selain dikelilingi oleh berbagai sel glia, juga dikelilingi oleh *protein transmitter* yang menempel pada neuron dengan jumlah cukup banyak (Gambar 4). Beberapa neuron ditemukan memiliki myelin. Myelin tampak seperti badan neuron namun berukuran kecil dan hanya terdapat pada akson (Gambar 4B). Antar myelin dipisahkan oleh nodus Ranvier yang merupakan bagian akson yang tidak bermyelin. Myelin berfungsi untuk melindungi akson dan meningkatkan kecepatan impuls. Pada saraf perifer myelin dibentuk oleh sel Schwann, sedangkan pada saraf pusat dibentuk oleh oligodendrosit (Agamanolis, 2010).

Komposisi Neuron dan Glia. Hasil kultur *in vitro* menunjukkan bahwa jumlah neuron dan glia yang dikultur dalam mDMEM dengan ITS secara nyata lebih tinggi dibandingkan dengan dalam mDMEM. Namun, persentase neuron dan glia dalam kedua medium tersebut tidak berbeda nyata. Komposisi rata-rata persentase neuron dan glia dalam mDMEM + ITS adalah masing-masing $47,2 \pm 1,1$ dan $52,8 \pm 1,1$ tidak berbeda nyata dengan dalam MDEM yaitu masing-masing $48,5\% \pm 10,3$ dan $51,5 \pm 10,3$ (Tabel 3). Hal



Gambar 4 A. Morfologi neuron. a: akson, d: dendrit, s: soma, n: inti sel, tanda panah: *protein transmitter*. B. Neuron bipolar dengan akson bermyelin (kepala panah hitam) yang dipisahkan oleh nodus Ranvier. Preparat natif. Bar: 10 μ m.

tersebut menunjukkan bahwa penambahan ITS ke dalam medium kultur mampu meningkatkan proliferasi baik neuron maupun glia.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa, jumlah sel glia 10 kali lebih banyak dibandingkan dengan neuron dan mengisi jaringan saraf sebesar 90% (Kettenmann dan Ransom, 1995; Zhang, 2001; Beitz dan Fletcher, 2006). Sel glia memiliki jumlah lebih banyak karena digunakan untuk membantu

Tabel 2 Persentase neuron dan sel glia yang berkembang di dalam kultur (%)

Jenis sel	Medium		Rataan
	mDMEM	mDMEM+ITS	
Neuron	$48,5 \pm 10,3$	$47,16 \pm 1,06$	47,8
Sel glia	$51,5 \pm 10,3$	$52,84 \pm 1,06$	52,2

Huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Tabel 3 Rataan panjang akson dan dendrit pada medium mDMEM dan mDMEM+ITS

Parameter	Ukuran panjang (μ m) dalam medium kultur	
	mDMEM	mDMEM+ITS
Akson	$167,7 \pm 9,6$	$211,3 \pm 36,4$
Dendrit	$102,5 \pm 6,6$	$115,0 \pm 26,9$

Huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

pertumbuhan neuron melalui absorpsi nutrisi secara optimal. Pada otak manusia, persentase komposisi neuron dan sel glia adalah sama. Pewarnaan HE kurang mampu menggambarkan sel glia secara jelas terutama untuk sel yang berukuran sangat kecil. Penggunaan imunositokimia dalam pewarnaan sel dapat membantu identifikasi sel glia secara jelas (Beitz dan Fletcher, 2006).

Panjang Akson dan Dendrit Neuron.

Panjang akson dalam mDMEM+ITS berkisar antara 52,2-478,5 μm (rata-rata 211,3 μm) dan panjang dendrit 20,3-252,3 μm (rata-rata 115 μm). Panjang akson dalam mDMEM tanpa ITS berkisar dari 58-469 μm (rata-rata 167,7 μm) dan panjang dendrit 20,3-432 μm (rata-rata 102,5 μm). Rata-rata panjang akson dan dendrit neuron yang dikultur dalam mDMEM + ITS lebih panjang dibandingkan dengan yang dikultur dalam mDMEM; namun tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (Tabel 2).

Akson dan dendrit dijadikan salah satu parameter ukuran pertumbuhan sel karena neuron yang *mature* dilihat dari ukuran akson dan dendrit yang dimilikinya. Hasil pengukuran menunjukkan panjang akson dan dendrit yang dihasilkan dari kultur neuron memiliki ukuran bervariasi yaitu berkisar antara 20-400 μm . Pada neuron tikus, ukuran dendrit yang paling pendek adalah 20,8 μm dan dapat mencapai

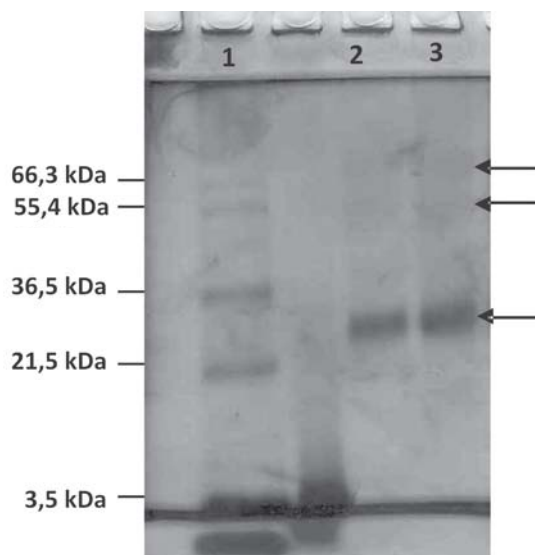
panjang 250-300 μm , sedangkan ukuran akson tikus kurang dari 1 mm dan dapat mencapai panjang 1 cm (Barres, 1997). Ukuran panjang akson dan dendrit pada neuron hasil kultur *in vitro* sangat bervariasi dan secara umum ukuran akson yang dihasilkan lebih pendek. Hal tersebut mengindikasikan terjadinya proses pertumbuhan neuron yang sangat bervariasi, di samping itu, walaupun neuron cukup dapat teramati dengan pewarnaan HE, namun penjurulan neuron tidak terwarnai jelas dengan HE. Untuk itu diperlukan pewarnaan akson dan dendrit yang lebih baik seperti pewarnaan perak *Bielschowsky stain* (Agamanolis, 2010).

Analisis Protein Kultur Sel Serebrum dengan Menggunakan SDS-PAGE

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa *conditioned medium* (CM) yang dikoleksi dari kultur sel serebrum baik dari medium mDMEM maupun mDMEM+ITS menghasilkan tiga pita dengan perkiraan berat molekul (BM) masing-masing +66 kDa, +55 kDa dan +30 kDa; dan yang terakhir (+30 kDa) menunjukkan intensitas pita paling tebal (Gambar 5). Sampel CM medium dengan penambahan ITS menunjukkan intensitas warna yang lebih gelap pada gel elektroforesis yang mengindikasikan konsentrasi protein yang lebih tinggi. Hal tersebut selaras dengan hasil pada Tabel 1 yang menunjukkan bahwa jumlah sel yang tumbuh dalam mDMEM+ITS lebih tinggi dibandingkan dengan dalam mDMEM sehingga sekresi protein yang dihasilkan memiliki konsentrasi yang lebih tinggi.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa baik neuron maupun glia menghasilkan beberapa *growth factor* yang bersifat neurotropik yang dapat mengatur proses neurogenesis (Taupin *et al.*, 2000), di antaranya adalah *nerve growth factor* (NGF; 30 kDa) (Bocchini dan Angeletti, 1969), *brain-derived growth factor* (BDGF, 27.8-30 kDa) (Kato-Semba *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 2008), GDNF 39 kDa (Lin *et al.*, 1993), nestin (240 kDa), dan GFAP (52 kDa) (Jung *et al.*, 2007), di samping itu juga menghasilkan berbagai macam protein diantaranya protein MBP (*myelin basic protein*) 21,5 kDa dan protein PLP (*proteolipid protein*) 30 kDa (Aruga *et al.*, 1991; Greer dan Lees, 2002). Kedua protein MBP dan PLP merupakan komponen utama (60-80%) dalam pembentukan membran myelin (Quarles *et al.*, 2006).

Berdasarkan bobot molekulnya, diperkirakan protein utama yang secara



Gambar 5 Hasil SDS-PAGE *Conditioned Medium* kultur sel serebrum yang diwarnai dengan perak nitrat. (1) Marka protein; (2) mDMEM; dan (3) mDMEM+ITS. Tanda panah menunjukkan pita-pita protein.

dominan dihasilkan dalam konsentrasi yang tinggi adalah NGF dan BDNF. Namun demikian, perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk mengetahui secara pasti protein yang dihasilkan tersebut. Baik NGF maupun BDNF merupakan neurotropin, dihasilkan oleh neuron hipokampus dan korteks serebrum serta berfungsi sebagai parakrin atau autokrin untuk memelihara daya hidup neuron serta menginduksi dan mengatur neurogenesis (Matsumoto *et al.*, 2008). Taupin *et al.*, (2000) melaporkan bahwa dalam kultur beberapa *growth factor* yang disintesis oleh NPCs dan NSCs dalam kultur dibutuhkan untuk pertumbuhan sel-sel tersebut.

Nerve growth factor merupakan protein yang memiliki peran penting dalam memelihara dan menjaga daya tahan hidup neuron, serta menginduksi proses neurogenesis dan gliogenesis termasuk pertumbuhan akson dan dendrit (Cattaneo dan McKay, 1990; Freeman *et al.*, 2004; Fiore *et al.*, 2009; Madduri *et al.*, 2009). Menurunnya konsentrasi NGF dalam serum mengindikasikan fase preklinis dari neurodegeneratif, khususnya pada penderita Alzheimers (Schaub *et al.*, 2002), oleh karena itu penggunaan NGF sangat potensial untuk mengurangi terjadinya degenerasi neuron (Tuszynski dan Blesch, 2004).

Growth factor lainnya yang memiliki homologi struktur dan fungsi yang serupa dengan NGF adalah BDNF, neurotrophin-3 (NT-3) dan neurotrophin-4 (NT-4) (disebut juga NT-5). Namun, sekresi yang paling utama adalah NGF dan BDNF. Produk mRNA BDNF dan NT-3 telah terdeteksi di otak manusia dewasa dan berfungsi untuk memelihara sistem saraf (Murer *et al.*, 2001). Walaupun NGF dan BDNF memiliki fungsi yang serupa, keduanya memiliki reseptor yang berbeda yakni masing-masing memanfaatkan reseptor Trk A dan Trk B (Fawcett *et al.*, 1997; Binder dan Scharfman, 2004).

Brain-derived growth factor berfungsi baik pada susunan saraf pusat maupun perifer untuk memelihara atau mempertahankan daya hidup neuron, mendukung pertumbuhan dan diferensiasi neuron dan sinaps baru (Acheson *et al.*, 1995; Huang dan Reichardt, 2001). Di otak, BDNF aktif di bagian hipokampus, korteks, dan otak depan yang merupakan daerah utama untuk aktivitas belajar, memori (terutama memori jangka panjang), dan berfikir (Yamada dan Nabeshima, 2003; Mariana *et al.*, 2005; Bekinshtein *et al.*, 2008). Mencit mutan tanpa

memiliki kemampuan untuk mensekresikan BDNF menunjukkan terjadinya kecacatan pada otak dan sistem saraf sensoris serta mengalami kematian beberapa saat setelah lahir. Hal tersebut menunjukkan bahwa BDNF memegang peran penting dalam perkembangan sistem saraf yang normal (Ernfors *et al.*, 1995; Murer *et al.*, 2001).

SIMPULAN

Kultur *in vitro* sel serebrum anak tikus menghasilkan neuron bipolar dan multipolar serta sel-sel glia berupa astrosit, oligodendrosit, dan mikroglia. Penambahan *insulin transferin selenium* ke dalam medium kultur secara nyata meningkatkan jumlah sel-sel serebrum (neuron dan glia) serta sekreta protein dengan ukuran 30kDa.

SARAN

Kultur neuron menghasilkan protein yang diduga mengandung *growth factor* tertentu. Oleh karena itu diperlukan identifikasi, purifikasi, dan penghitungan konsentrasi protein tersebut. Peneguhan terhadap identifikasi sel-sel yang berkembang dalam kultur neuron dapat dilakukan dengan pewarnaan yang lebih spesifik yaitu imunositokimia.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ditjen DIKTI Kementerian Pendidikan Nasional atas dukungan dana penelitian program Hibah Bersaing No. kontrak 24/13.24.4/SPK/BG-PD/2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM. 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374 (6521): 450–453.
- Agamanolis DP. 2010. *Applied Neurocytology and Basic Reactions*. <http://neuropathology.neoucom.edu/chapter1/chapter1c/Oligodendroglia.html>. [09 Agustus 2010].

- Aruga J, Okano H, Mikoshiba K. 1991. Identification of the new isoforms of mouse myelin basic protein: the existence of exon 5a. *J. Neurochem.* 56: 1222–1226.
- Barres BA. 1997. *Neuron-glia Interactions*. Di dalam Cowan WM, Jessel TM, Zipursky SL, editor. Molecular and Cellular Approaches to Neural Development. USA: Oxford University Press.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl Acad Sci* 105 (7): 2711–2716.
- Beitz AJ, Fletcher TF. 2006. *Nervous Tissue*. Di dalam Eurell JA, Frappier BL, editor. Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. USA: Wiley Blackwell.
- Binder DK, Scharfman HE. 2004. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* 22 (3): 123–131.
- Bocchini V, Angeletti PU. 1969. The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc Natl Acad Sci* 64:787-794.
- Cameron HA, Hazel TG, McKay RD. 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitter. *J Neurobio.* 36(2):287-306.
- Cao Q, Benton RL, Whittenmore SR. 2002. Stem cell repair of central nervous system injury. *J Neurosci Res* 68:501-510.
- Cattaneo E, McKay R. 1990. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347: 762 - 765
- Choi J, Ko J, Racz B, Burette A, Lee JR, Kim S, Na M, Lee HW, Kim K, Weinberg RJ, Kim E. 2005. Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci.* 25:869-879.
- Colville T, Bassett JM. 2002. *Clinical Anatomy dan Physiology for Veterinary Technicians*. United States of America: Mosby Inc .
- Davis JM. 2011. Basic techniques and media, the maintenance of cell lines, and safety. Di dalam *Animal cell culture essential methods*. John MD, Editors. UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Erickson RI, Paucar AA, Jackson RL, Visnyei K, Kornblum H. 2008. Roles of insulin and transferrin in neural progenitor survival and proliferation. *J Neurosci Res* 86(8):1884-94.
- Ernfors P, Kucera J, Lee KF, Loring J, Jaenisch R. 1995. Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int J Dev Biol* 39 (5): 799–807
- Fields, RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298(5593): 556-562.
- Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L. 2009. Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems. *Rev. Neurosci* 20 (2):133-145.
- Freeman RS, Burch RL, Crowder RJ, Lomb DJ, Schoell MC, Straub JA, Xie L. 2004. NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand?. NGF and related molecules in health and disease. *Prog Brain Res* 146: 111–26.
- Freshney RI. 1994. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3rd ed. New York: Wiley-Liss. Pp 90-94.
- Gage FH. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Goldman SA. 2004. Directed mobilization of endogenous neural progenitor cells: the intersection of stem cell biology and gene therapy. *Curr Opin Mol Ther* 6:466–472.
- Gould E, Tanapat P. 1997. Lesion induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci* 80:427-436.
- Govind S, Kozma R, Monfries C, Lim L, Ahmed S. 2001. Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *J Cell Biol.* 152:579-594.
- Greer, JM, Lees, M B. 2002. Myelin proteolipid protein—the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 211–215.
- Guerra-Crespo M, Gleason D, Sisto A, Toosky T, Solaroglu I, Zhang JH, Bryant PJ, Fallon JH. 2009. Transforming growth factor- α induces neurogenesis and behavioral improvement in a chronic stroke model. *Neurosci* 160(2):470-483.

- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH. 2000. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20:2218–2228.
- Huang YC, Huang YY. 2006. Tissue engineering for nerve repair. *Biomed Appl Basic Comm*. 18:100-110.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2001. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci* 24: 677–736.
- Jung CS, Foerch C, Schanzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M. 2007. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*. 30(12): 3336-3341.
- Fawcett JP, Raquel Aloyz, John H. McLean§, Sangeeta Pareek, Freda D. Miller, Peter S. McPhersoni, and Richard A. Murphy. 1997. Detection of Brain-derived Neurotrophic Factor in a vesicular fraction of brain synaptosomes. *J Biol Chem* 272 (14): 8837–8840.
- Jackson JS, Golding JP, Chapon C, Jones WA, Bhakoo KK. 2010. Homing of stem cells to sites of inflammatory brain injury after intracerebral and intravenous administration: a longitudinal imaging study. *Stem Cell Research and Therapy* 1:17.
- Kalverbour AF, Genta ML, Hopkins JB. 1999. *Current Issues in Developmental Psychology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K. 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem* 69(1):34-42.
- Kettenmann H, Ransom BR. 1995. Neuroglia. New York, Oxford University Press.
- Lee J C, Mayer-Proschel M, Rao MS. 2000. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30(2): 105-121.
- Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. 2002. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord* 4(2):117-128.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Collins F. 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260 (5111): 1130-1132
- Ma BF, Liu ZM, Xie XM, Zhang AX, Zhang JQ, Yu Wh, Ming XM, Li SN, Lahn BT, Xiang AP. 2006. Slower cycling of nestin-positive cells in neurosphere culture. *Dev. Neurosci*. 7(4):377-381.
- Madduri S, Papaloïzos M, Gander B. 2009. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation *in vitro*. *Neurosci Res* 65 (1): 88-97.
- Mariana A, Bekinschtein P, Cammarota M, Vianna MRM, IzquierdoI, Medina JH. 2005. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem* 12: 504-510.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA. 2008. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci* 11: 131-133.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Pro. Neurobiol* 63: 71-124.
- Ohori Y, Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Yamamoto N, Nakamura K, Nakafuku M. 2006. Growth Factor Treatment and Genetic Manipulation Stimulate Neurogenesis and Oligodendrogenesis by Endogenous Neural Progenitors in the Injured Adult Spinal Cord . *J Neurosci* 26(46): 11948-11960.
- Quarles RH, Macklin WB, Morell P. 2006. Myelin Formation, Structure and Biochemistry in: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. American Society for Neurochemistry. Elsevier, Inc Publisher. pp 51-71.
- Pfeiffer, S E, Warrington AE, B R. 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Bio* 3: 191-197.
- Renold BA, Weiss S. 1992. *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. *Science* 255:1707-1710.
- Sabayan B, Foroughinia F, Mowla A, Borhanihaghighi A. 2008. Role of Insulin Metabolism Disturbances in the Development of Alzheimer Disease: Mini Review. *AM J Alzheimers Di.s* 23 (2): 192-199.

- Schaub RT, Anders D, Golz G, Gohringer K, Hellweg R. 2002. Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. *Am J Psychiatric* 159:1227-1229.
- Sullivan KA, Kim B, Feldman EL. 2008. Minireview: Insulin-Like Growth Factors in the Peripheral Nervous System. *Endocrinology* 149(12):5963–5971.
- Taupin P, Ray J, Fischer WH, Suhr ST, hakansson K, Grubb A, Gage FH. 2000. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron* 28(2):385-397.
- Taupin P, Gage FH. 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69(6):745-749.
- Tuszynski M, Blesch A. 2004. Nerve growth factor: from animal models of cholinergic neuronal degeneration to gene therapy in Alzheimer's disease. *Progress in Brain research* 146:6079-60123.
- Yamada K, Nabeshima T. 2003. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91 (4): 267-70.
- Yiu G, He Z. 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 7:617-627.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johanson CB, Brismar H, Shupliankov O, Frisen J, Janson AM. 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Aca Sci* 100(3):7925-7930.
- Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M. 2001. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neurosci* 105:33-41.
- Zhang, SC. 2001. Defining glial cells during CNS development. *Nat Rev Neurosci* 2(11): 840-843.