

## Optimization of Neuron cells Maturation and Differentiation

Choirunil Chotimah<sup>1,4)\*</sup>, Masruroh Rahayu<sup>2)\*</sup>, Gatot Ciptadi<sup>3)</sup>, Fatchiyah Fatchiyah<sup>1)†</sup>

<sup>1)</sup> Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

<sup>2)</sup> Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

<sup>3)</sup> Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang

<sup>4)</sup> Program Pascasarjana Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

\*Kontribusi kedua peneliti ini sama sebagai penulis pertama

†Corresponding author: Prof. Fatchiyah, PhD.

Jurusan Biologi, FMIPA-UB, Jl Veteran, Malang 65145, Indonesia

e-mail: [fatchiya@ub.ac.id](mailto:fatchiya@ub.ac.id)

### ABSTRACT

Neurodegenerative disease is the brain and spinal cord attacks to turn off his cell. One of the diseases that prevalence of HAD neurodegenerative is now increased by approximately 37%. The purpose of this study was to determine the optimal time of growth of cultured brain neurons in rats (*Rattus norvegicus*) and know the stages of morphological differentiation of rat brain neurons. Isolate of neuron cells was provided from fetal rat neurons, aged 18-19 days, and then cells grown in vitro on MEM+10%FBS+3%Penstrep culture medium. Cells growth observed once each day during 14 days. The results obtained are optimal neuronal cell growth are on the eighth day. Morphological differentiation of neuronal cells began on day 1 of the form neuroblast cell morphology apolar (rounded), the 2nd day of neuronal cell morphology in the form of bipolar neuroblast (already formed axon and dendrites), on day 3 to day 14 cells already mature, with cell morphology namely bipolar neurons, pyramidal and multipolar. Mature neuron cells that have optimizations on the 10th day.

Key words : *diferentiation, neuron culture, neuron morphology, proliferation.*

### ABSTRAK

Penyakit neurodegenerasi adalah penyakit yang menyerang sel otak dan sumsum tulang belakang dengan mematikan selnya. Salah satu penyakit neurodegenerasi adalah HAD yang prevalensinya sekarang meningkat sekitar 37 %. Oleh karena itu, peneliti mengembangkan penelitian untuk mencari obat yang dapat mencegah atau mengobati penyakit ini, salah satunya dalam bidang kultur jaringan dan sel hewan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis waktu optimal pertumbuhan kultur neuron otak tikus (*Rattus norvegicus*) dan tahapan diferensiasi morfologi sel neuron otak tikus. Penelitian ini dilakukan dengan cara mengisolasi sel neuron fetus tikus yang berumur 18-19 hari dan ditumbuhkan secara *in vitro* (MEM+10%FBS+3%Penstrep). Hasil yang didapatkan adalah pertumbuhan sel neuron yang optimal terdapat pada hari kedelapan. Diferensiasi morfologi sel neuron dimulai pada hari ke-1 dengan morfologi sel berupa neuroblast apolar (berbentuk bulat), hari ke-2 morfologi sel neuron berupa neuroblast bipolar (sudah terbentuk akson dan dendrit), pada hari ke-3 sampai hari ke-14 sel sudah matang, dengan morfologi sel yaitu neuron bipolar, piramidal dan multipolar. Sel neuron yang matang mengalami optimalisasi pada hari ke-10.

Kata kunci : *diferensiasi, kultur neuron, morfologi neuron, pertumbuhan sel neuron.*

## PENDAHULUAN

Otak dan sumsum tulang belakang terdiri dari kelompok-kelompok neuron yang bekerja dengan berbagai macam fungsi, seperti kontrol pergerakan, memproses informasi sensorik, dan pembuatan keputusan. Proses neurodegenerasi terjadi disfungsi sistem saraf yang disebabkan oleh berkurangnya sel-sel neuron pada struktur saraf, seperti halnya yang terdapat pada penyakit neurodegeneratif otak. Penderita neurodegenerasi akan mengalami gangguan memori dan pergerakan [1]. Penyakit neurodegeneratif dikelompokkan menjadi dua macam yaitu penyakit neurodegeneratif primer dan sekunder. Neurodegeneratif primer misalnya penyakit Alzheimer dan penyakit Parkinson, sedangkan neurodegeneratif sekunder adalah *Human Immunodeficiency Virus-associated dementia complex* (HAD).

Pengetahuan tentang mekanisme terjadinya HAD, obat atau terapi yang dapat digunakan, perkembangan penyakit maupun hasil pengobatannya memerlukan penelitian mulai dari tingkat sel, jaringan, organ baik secara *in vitro* maupun *in-vivo*. Sehubungan dengan hal tersebut diatas peneliti akan melakukan penelitian dengan pendekatan seluler melalui metode kultur sel hewan yakni kultur campuran neuron-glia. Kultur jaringan dan sel hewan mulai diperhatikan oleh para peneliti sejak awal abad 20 yang lalu, terutama untuk melakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui perilaku sel hewan [2]. Lingkungan kultur yang berbeda dengan kondisi *in vivo* akan menyebabkan berkurangnya interaksi antar sel dan interaksi matriks dengan sel, sehingga berpengaruh terhadap proliferasi sel [3]. Selama perkembangan kultur, sel juga mengalami proses diferensiasi.

Dalam suatu penelitian penting sekali diketahui tentang proliferasi dan diferensiasi sel untuk mengetahui kapan waktu optimal dilakukan perlakuan. Penghitungan rata-rata proliferasi sel sering digunakan untuk menentukan respon sel terhadap stimulus atau zat toksik. Kuantitas pertumbuhan sel di dalam kultur juga penting untuk dijaga atau dipertahankan agar dapat diketahui konsistensi kultur, saat yang baik untuk dilakukan subkultur, dilusi optimum, perkiraan densitas sel, menguji media, serum, dan substrat [3]. Oleh karena itu, diperlukan suatu kajian

mengenai optimalisasi pertumbuhan dan diferensiasi sel neuron, telah dilakukan observasi pertumbuhan kultur neuron otak tikus (*Rattus norvegicus*) dan analisis tahapan diferensiasi morfologi sel neuron otak tikus.

## METODE

**Kultur Neuron-Glia Otak Tikus [4].** Tikus bunting (18-19 hari) disemprot dengan alkohol 70 %, dilakukan dislokasi leher kemudian dibedah dan diambil fetusnya. Fetus dicuci dengan larutan PBS steril (*Phosphat Buffer Saline*), kemudian alkohol 70% sebentar, dan PBS steril kembali. Fetus dibawa ke dalam LAF (*Laminar Air Flow*) (Esco, USA). Plasenta dibuka dan kepala fetus dipotong dengan menggunakan gunting dan pinset. Kepala dimasukkan ke dalam PBS yang ditambah dengan antibiotik Penstrep (*Penicillin Streptomycin*) (Sigma Chemical Co., USA) kemudian dibedah dan diambil otaknya. Otak fetus diletakkan pada cawan petri yang berisi larutan PBS Penstrep, dibersihkan dari meninges dan darah. Otak yang sudah bersih kemudian diletakkan di dalam botol falcon 15 mL (BD, USA) dan ditambah dengan Tripsin EDTA (Sigma Chemical Co., USA) (1:1) sesuai dengan volume otak, diinkubasi selama 15 menit di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37<sup>0</sup>C (Binder, USA). *Plate Well* 12 (Corning, USA) disiapkan dan diberi *coverslip* (Assistent, Germany) di dalamnya, dilapisi dengan gelatin (Sigma Chemical, USA) dengan menggunakan filter 0,20 µm (Corning, Germany) dan jarum spuit (Terumo, Jepang), diinkubasi dalam LAF selama 30 menit. Setelah 15 menit, otak ditambahkan dengan 3200 µL 10% FBS (Gibco, USA) dalam PBS dan dihomogenasi dengan sentrifugasi kecepatan 1200 rpm selama 2 menit menggunakan sentrifus (MSE Ministral 1000, United Kingdom). Supernatan diambil dengan mikropipet dan dibuang, kemudian ditambahkan 3200 µL 10% FBS dalam PBS dan dihomogenasi dengan sentrifugasi kecepatan 1200 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dengan mikropipet dan dibuang, kemudian pelet ditambahkan dengan media non serum (*Minimum essential medium Eagle's/MEM*) (MP Biomedicals, Germany), kemudian dihomogenasi dengan sentrifugasi kecepatan 1200 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dengan mikropipet dan dibuang, pelet ditambahkan dengan

*complete media* ( 3% Penstrep + 10% FBS + MEM) sampai 12 mL, dihomogenasi dengan mikropipet. Kemudian otak ditanam di *plate well*-12, setiap *well* 1000  $\mu$ L. *Plate* disemprot dengan alkohol 70 % dan dimasukkan ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5 % suhu 37°C. Kultur diinkubasi selama 9 hari dengan pencucian sel selama 2 hari sekali

**Pencucian Sel Neuron-Glia.** Pencucian sel dilakukan dengan membuat 15 mL *complete media* (3% Penstrep + 10% FBS + MEM) kemudian di inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C selama 15 menit. Media di dalam *plate well* diambil dan diganti dengan media non serum dilakukan sebanyak 2 kali. Setelah pencucian dengan media non serum selesai, media diganti dengan *complete media*.

**Menghitung Sel.** Penghitungan sel neuron dilakukan setelah sel selapis, jumlah sel hidup dihitung berdasarkan pengamatan mikroskopis dengan mikroskop inverted (Olympus, Germany) perbesaran 200 x yaitu sel yang masih melekat pada dasar *plate* dan mempunyai sitoplasma yang bisa teramati, penghitungan dilakukan mulai hari ke-1 sampai dengan hari ke-14. Pengamatan dilakukan pada 5 titik per lapang pandang dari coverslip yang diambil per sumur kemudian dihitung nilai reratanya [5].

**Imunohistokimia.** *Plate-well* 12 difiksasi dengan paraformaldehid (PFA) selama 15 menit, kemudian dicuci dengan PBS steril 1x 5 menit. Ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 15 menit ( $\pm$  1 cc). Dicuci PBS 3x5 menit, kemudian ditetesi *blocking buffer* selama 60 menit ( $\pm$  1 cc). Diinkubasi dengan antibodi primer untuk neuron anti MAP-2(*Microtubule Associated Protein-2*) (Santa Cruz, California) (1:1000) masing-masing sumur 500  $\mu$ L selama semalam. Dicuci PBS 3x5 menit ( $\pm$  1 cc). Ditetesi dengan antibodi sekunder (anti mouse biotin) (Santa Cruz, California) (1:200) masing-masing sumur 500  $\mu$ L, diinkubasi selama 1 jam kemudin dicuci PBS 3x5 menit ( $\pm$  1 cc). Selanjutnya ditetesi dengan SA-HRP (1:1000) (Daco, Inc., USA) selama 40-50 menit kemudian dicuci PBS 3x5 menit ( $\pm$  1 cc). Selanjutnya diberikan chromogen untuk HRP yaitu DAB (*Diamino Benzidine*) (Daco, Inc., USA) 1 mL selama 20-30 menit, dicuci PBS 3x5 menit ( $\pm$  1 cc). Kemudian dicuci akuades selama 3x 5 menit. Selanjutnya

dilakukan *counterstaining* dengan mayer hematoxilin (Lab Vision, California) ditambah air sebagai pengencer sampai terendam, selama 6 menit. Dicuci dengan air kran 3x5 menit. Coverslip diambil, diletakkan di tissue. Objek glass dilapisi enthelan, coverslip diletakkan di atas objek glass yang dilapisi enthelan (Merck, Germany). Setelah enthelan kering, ditambah dengan enthelan di atasnya dan ditutup dengan coverslip.

**Pengambilan Data.** Data berupa foto sel neuron diambil dari pengamatan dengan cara sel kultur di dalam *plate well* diamati dengan menggunakan mikroskop inverted (Olympus, Germany) dengan perbesaran 200 x. Pengamatan dilakukan setiap hari, dimulai dari hari ke-1 sampai hari ke-14. Data berupa morfologi neuron per hari.

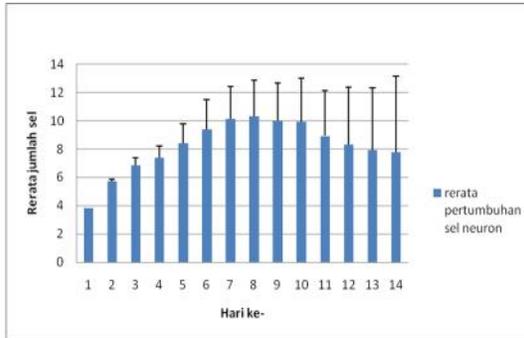
**Analisis Data.** Analisis data dilakukan secara deskriptif berdasarkan perubahan morfologi neuron dan rerata jumlah sel mulai dari hari ke-1 sampai hari ke-14.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Pertumbuhan Kultur Neuron Otak Tikus (*Rattus norvegicus*).** Kultur sel neuron yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari otak fetus tikus (*Rattus norvegicus*) pada umur kebuntingan 18-19 hari yang ditumbuhkan dalam media MEM. Metode ini diambil dari penelitian sebelumnya dan telah mengalami modifikasi [4]. Penggunaan otak janin sebagai sumber kultur sel karena sel neuron pada otak janin mempunyai kemampuan proliferasi lebih tinggi dibandingkan dengan sel neuron yang berasal dari jaringan otak dewasa [6]. Hasil dari kultur sel neuron otak tikus didapatkan bahwa jumlah sel pada hari pertama sampai hari kedelapan mengalami peningkatan karena proliferasi sel terus meningkat. Proliferasi sel mengalami saat yang optimal pada hari kedelapan (rerata jumlah sel tertinggi sebesar 10,33). Kemudian pada hari kesembilan sampai hari keempat belas proliferasi sel menurun, beberapa sel sudah ada yang mengalami apoptosis menyebabkan jumlah sel menurun. Hal ini dapat dilihat pada gambar 1.

Pada gambar 1 tampak bahwa pertumbuhan sel meningkat sesuai dengan fase log dan sangat produktif sampai pada hari kedelapan. Akan tetapi mulai hari kesembilan sampai hari keempat belas sel mengalami penurunan

jumlah sel. Hal ini sejalan dengan proses diferensiasi sel neuroblast menjadi sel multipolar neuron. Proses proliferasi kultur neuron pada tahap pertumbuhan yang tercepat adalah pada hari pertama sampai hari kelima. Setelah tahap pertumbuhan yang cepat tersebut, rata-rata pertumbuhan mulai menurun [7]. Hal ini dikarenakan sel sudah berdiferensiasi sehingga pembelahan sel berkurang dan bahkan tidak ada [3]. Pada hari kedua sampai ketiga sel neuron mulai berinteraksi dengan sel neuron lainnya [8].



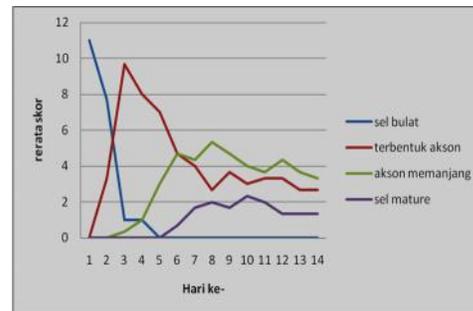
Gambar 1 Pertumbuhan sel neuron dari hari ke-1 sampai hari ke-14. Rerata jumlah sel yang paling tinggi terdapat pada hari ke-8.

Pada hari ke-6 kultur, sel neuron berinteraksi untuk membentuk jaringan antara sel satu dengan sel lainnya. Selama proses pertumbuhan, sel neuron tidak hanya berinteraksi dengan sel tetangganya tetapi juga dengan neurit dari tubuh sel neuron sendiri. Jaringan akan berubah secara signifikan tergantung dari umur dan tahap perkembangan sel. Setelah tahap awal pembentukan neurit tubuh sel neuron mulai membentuk kumpulan. Proses pembentukan kumpulan sel disertai dengan penggabungan cabang dan seluruh neurit. Somata akan berpindah seiring dengan pembentukan sel neuron, kultur sel neuron tunggal akan berkembang menjadi kumpulan sel neuron yang dihubungkan dengan urat saraf yang tebal [7]. Pada hari ke-7 tubuh sel neuron mengalami peningkatan ukuran dan peningkatan proses perluasan jaringan [8].

**Diferensiasi Morfologi Sel-Sel Neuron Otak Tikus (*Rattus norvegicus*).** Pengamatan morfologi neuron dilakukan dengan mikroskop inverted (Olympus) dengan perbesaran 200x. Untuk mengetahui apakah morfologi yang diamati adalah sel neuron, maka dilakukan pengecatan sel dengan teknik imunohistokimia

dengan antibodi *microtubule associated protein-2* (MAP-2). *Microtubule associated protein-2* merupakan marker khusus untuk sel neuron [4]. Berdasarkan pengamatan morfologi kultur sel neuron, didapatkan data perubahan morfologi sel neuron selama 14 hari. Pada hari pertama morfologi neuron masih berbentuk sel bulat, pada hari kedua sel sudah mulai membentuk akson, jumlah sel yang membentuk akson yang paling banyak terjadi pada hari ketiga. Pada hari ketiga sampai hari keempat belas sel neuron sudah *mature* dengan morfologi sel yang berupa badan sel dengan inti sel bulat memanjang, terbentuk akson yang memanjang dan membentuk hubungan dengan sel neuron lainnya. Sel neuron yang *mature* mengalami optimalisasi pada hari kesepuluh dan akan terus berdiferensiasi sampai hari keempat belas, oleh karena itu morfologi sel neuron yang sudah terbentuk akson dan morfologi sel neuron yang aksonnya memanjang akan tetap ada sampai hari keempat belas. Hal ini dapat dilihat pada gambar 2.

Morfologi neuron yang berbentuk sel bulat akan berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk akson pada hari kedua. Sel neuron mulai membentuk dendrit dan pemanjangan akson pada hari ketiga sampai hari keempat belas. Diferensiasi ini akan berlangsung sampai sel neuron *mature* dimulai dari hari ketiga sampai hari keempat belas.



Gambar 2 Perbandingan skor morfologi neuron per hari

Kultur sel neuron yang ditumbuhkan pada media MEM sudah menempel pada coverslip saat hari pertama. Sel yang tidak menempel pada coverslip akan terbuang saat pencucian sel dengan media *serum free*. Berdasarkan gambar 3 dapat dilihat bahwa kultur otak tikus pada hari pertama sampai dengan hari keempat belas menunjukkan adanya perbedaan morfologi. Perbedaan morfologi ini

menunjukkan bahwa sel mengalami pertumbuhan. Pada hari pertama sel masih berbentuk bulat disebut dengan *apolar neuroblast*. Pada hari kedua sel neuron sudah mulai membentuk akson yang kemudian akan terus memanjang dan membentuk suatu hubungan dengan akson lainnya, sel neuron berdiferensiasi membentuk *bipolar neuroblast*. Pada hari ketiga sampai hari keempat belas akson sudah memanjang dan membentuk jaringan dengan akson lainnya, dendrit sudah terbentuk (neuron *mature*) dengan morfologi berupa *bipolar neuron*, *pyramidal neuron*, dan *multipolar neuron*.

Proses perkembangan neuron adalah awalnya neuroblast melakukan proses pemanjangan ke lumen, tetapi ketika neuroblast berpindah ke *mantle layer* proses ini tidak terlihat dan neuroblast untuk sementara membulat menjadi apolar. Kemudian terjadi proses pertumbuhan dua sitoplasmik baru pada sisi yang berlawanan di tubuh sel, membentuk *bipolar neuroblast* [9]. Hari kedua setelah *plating* neurit atau akson berkembang dari soma, bercabang dan berhubungan dengan neurit lain [7]. Pertumbuhan sel neuron pada hari keenam menunjukkan sel-sel yang saling berlekatan antara yang satu dengan yang lain dan bentuk morfologi sel-sel yang tumbuh bervariasi [10]. Perkembangan sel neuron dari hari pertama sampai dengan hari keempat belas dapat dilihat pada gambar 4.

Selain itu, jarak antar sel yang relatif dekat dan jumlah sel yang semakin banyak menandakan bahwa sel-sel mengalami pertumbuhan dengan baik dan mulai menunjukkan kondisi yang konfluen. Morfologi akson terlihat berbentuk lurus yang menunjukkan hubungan antara akson satu dengan akson lainnya [7]. Pada akhir proses pemanjangan, sel neuroblast bipolar dengan cepat membentuk akson primitif dan dendrit primitif. Sel ini berkembang menjadi sel neuron multipolar atau sel neuron dewasa [9].

Berdasarkan pengamatan morfologi sel neuron *mature* yang ditemukan pada kultur ini adalah sel neuron bipolar, neuron piramidal dan yang terbanyak adalah neuron multipolar. Sel neuron bipolar mempunyai satu dendrit dan satu akson, neuron piramidal mempunyai soma yang berbentuk piramid, dan neuron multipolar mempunyai satu akson dan sisanya merupakan dendrit [11]. Sel neuron bipolar mempunyai dendrit yang panjang dengan

beberapa cabang. Sel neuron bipolar mempunyai satu dendrit dan satu akson [12]. Sel neuron piramidal mempunyai dendrit dengan cabang yang banyak, soma berbentuk segitiga, dan dendrit apikalnya mencolok. Sel neuron multipolar mempunyai dendrit dengan cabang yang banyak. Perbedaan tipe morfologi sel neuron terlihat pada tahap awal diferensiasi [11].

Diferensiasi sel neuron dorsal pada embrio fetus usia 12-13 hari yaitu berawal dari progenitor neuroepithelial yang menyebabkan pemanjangan sel *radial glial* (RG) yang memiliki ukuran sepanjang zona ventrikuler sampai permukaan pial. Sel RG mengekspresikan faktor transkripsi Pax6 (*paired box 6*), RC2, dan Nestin. Sedangkan beberapa sub populasi mengekspresikan berbagai macam marker lainnya termasuk *brain lipid binding protein* (BLBP) dan *glutamate-aspartate transporter* (GLAST). Selain itu, sel RG juga menunjukkan perbedaan fungsi pada signal transduksi *Notch* dan potensial diferensiasi. Ciri-ciri khusus sel RG adalah sinkronisasinya dengan perkembangan siklus sel. Inti sel RG berpindah dari *apical* (ventrikuler) ke basal (pada fase G1) dan kembali (pada fase G2), proses ini menunjukkan perpindahan *interkinetic nuclear*. Perilaku ini dipercaya untuk meregulasi pembongkaran inti sel RG neurogenik melawan sinyal proliferasi seperti *notch signaling*. Sel RG dibagi secara asimetris pada permukaan ventrikuler dengan bidang pembelahan vertikal untuk menghasilkan sel RG dan sel neuron lainnya (neurogenesis langsung) atau *intermediate progenitor cell* (IPC) (neurogenesis tidak langsung). *Intermediate progenitor cell* adalah sel multipolar yang mengekspresikan T-box faktor transkripsi Tbr2 dan berpindah dari permukaan ventrikuler kemudian mengekspresikan *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) faktor transkripsi NeuroD untuk menghasilkan zona germinal sekunder atau *subventricular zone* (SVZ) yang membelah secara horisontal untuk menghasilkan dua sel neuron yang mengekspresikan Tbr1 [13].

## KESIMPULAN

Pertumbuhan sel neuron yang optimal terdapat pada hari kedelapan. Diferensiasi morfologi sel neuron dimulai pada hari pertama dengan morfologi sel berupa

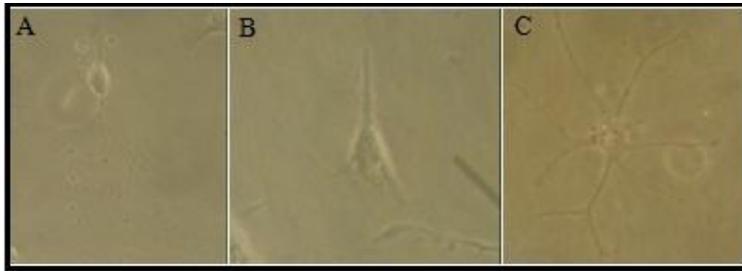
neuroblast apolar (berbentuk bulat), hari kedua morfologi sel neuron berupa neuroblast bipolar (sudah terbentuk akson dan dendrit), pada hari ketiga sampai hari keempat belas sel sudah *mature*, dengan morfologi sel yaitu neuron bipolar, piramidal dan multipolar, sel neuron sudah membentuk hubungan dengan sel neuron lainnya. Sel neuron yang *mature* mengalami optimalisasi pada hari kesepuluh.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

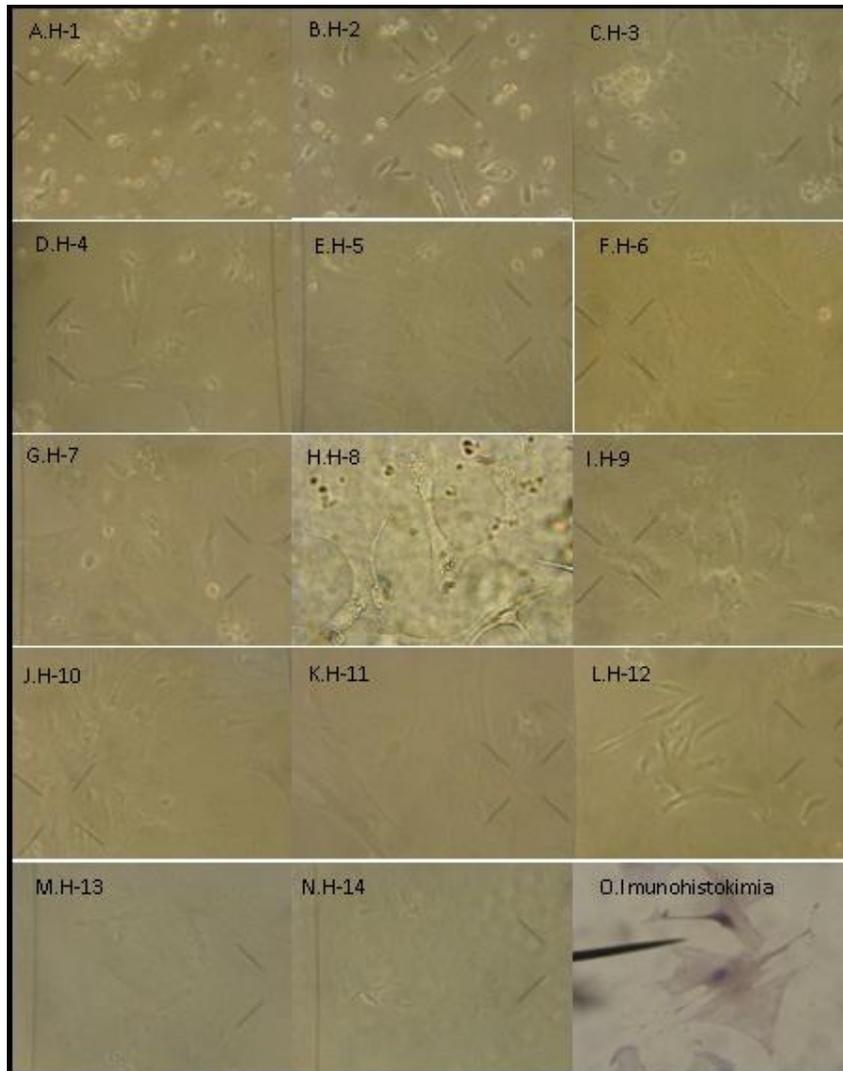
Terimakasih atas kerjasama untuk tim dan fasilitas laboratorium Biomedik FK UB dan laboratorium Biomol jurusan Biologi FMIPA UB untuk fasilitas hewan coba.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Bertram, L. dan E. T. Rudolph. 2005. The Genetic Epidemiology of Neurodegenerative Disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 115:6.
2. Djati, M. S. 2006. Teknologi Manipulasi dan Kultur Sel-Jaringan Hewan. Teknologi Dasar untuk Pengembangan Bioteknologi Hewan melalui Kultur Sel-Sel Spesifik. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.
3. Freshney, R. I. 2000. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. John Willey and Sons, Inc. New York.
4. Jana, M., A. Jana, U. Pal, dan K. Pahan. 2007. A Simplified Method for Isolating Highly Purified Neurons, Oligodendrocytes, Astrocytes, and Microglia from the Same Human Fetal Brain Tissue. *Journal of Neurochem Res*. 32(12): 2015–2022.
5. Nurmawati, T. 2008. Perubahan Jumlah Sel Neuron dan Mikroglia pada Kultur Neuron yang Dipapar dengan Lipopolysaccharide (LPS) dan Alfa Pinen. Tesis Program Studi Biomedik Kekhususan Farmakologi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
6. Murtyastami, K. 2008. Kajian Efek  $\alpha$ -Pinen terhadap iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) pada Kultur Sel Neuron-Glia yang Dipapar Lipopolisakarida (LPS). Skripsi Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
7. Shefi, O., I. Golding, R. Segev, E. B. Jacob, A. Ayali. 2002. Characterization of *in vitro* Neuronal Networks Morphological. *Physical Review*. 66 : 021905.
8. Ray, J., D. A. Peterson, M. Schinstine, dan F. H. Gage. 1993. Proliferation, Differentiation, and Long-Term Culture of Primary Hippocampal Neurons. *Journal of Neurobiology*. 90 : 3602-3606.
9. Sadler, T. W. 2004. Langman's Medical Embryology, Ninth Edition. Lippincott Williams and Wilkins. USA.
10. Listiani, R. F. D. 2008. Kajian Pengaruh  $\alpha$ -Pinen terhadap Konsentrasi NO (*Nitric Oxide*) pada Kultur Sel Neuron-Glia yang Dipapar LPS (Lipopolisakarida). Skripsi Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
11. Kriegsten, A. R. dan M. A. Dichter. 1983. Morphological Classification of Rat Cortical Neurons in Cell Culture. *Journal of Neuroscience*. Volume 3. 1634-1647.
12. Junqueira, L. C., J. Carneiro, R. O. Kelley (Alih bahasa Jan Tambayong). 1995. Histologi Dasar. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
13. Sodersten, E. 2009. On Molecular Mechanism of Neural Differentiation and Forebrain Development. Karolinska Institutet. Swedia.



Gambar 3. Morfologi sel neuron *mature*. A. Neuron bipolar. B. Neuron piramidal. C. Neuron multipolar



Gambar 4. Perkembangan morfologi sel neuron dari kultur hari pertama sampai dengan hari keempat belas (A-N), Imunohistokimia sel neuron dengan pewarnaan menggunakan DAB tampak bahwa sitoplasma sel neuron berwarna coklat (O). Perbesaran 200x.