

Optimasi Penambahan Colcemid pada *Karyotyping* Kultur *Mecenchymal Stem Cells* (MSC) Mencit

OPTIMIZATION THE ADDITION OF COLCEMID FOR KARYOTYPING ON MURINE MESENCHYMAL STEM CELL ((MSC) CULTURE

Ratih Rinendyaputri, Frans Dany

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Jl. Percetakan Negara 23 Jakarta 10560, Indonesia
email: ratih79@yahoo.com

Submitted : 25-3-2015 Revised : 28-4-2015 Revised : 25-6-2015 Accepted: 21-8-2015

Abstract

Control of the genetic stability of stem cells prior to the conduct of therapy is essential to prevent effects such as stem cell transformation. Karyotyping is a conventional technique to conduct an analysis of the number and structure of chromosomes. The analysis can only be performed on metaphase stage that needs to be optimized to get the cell at that stage because the length of the cell cycle are different in the each cell types. This study aims to obtain an optimal time to get MSC at metaphase stage. The study was conducted at the stem cell laboratory of Center for Biomedical and Basic Technology of Health. The event begins with isolation using flushing technique at the femur and tibia of mice. Furthermore, the culture in vitro and induction colcemid 0,25µg/ml for 8,16 and 24 hours to get the MSC at metaphase stage. KCl solution with a concentration of 0.075 M and 0,045 M used as a solvent hipotonis. Results showed that 16 hours of induction colcemid 0,25µg/ml in 0.075 M KCl solution usage percentage of MSC who are at metaphase stage and do the highest analysis ($p<0.05$). In this study 16 hours induction colcemid 0,25µg/ml is the optimal time to obtain metaphase stage of the MSC from bone marrow of mice.

Keywords: *mecenchymal stem cell, karyotyping, colcemid*

Abstrak

Kontrol terhadap stabilitas genetik pada sel punca sebelum pelaksanaan terapi merupakan hal yang penting untuk mencegah efek seperti transformasi sel punca yang dapat terjadi. Secara konvensional dapat dilakukan karyotyping untuk melakukan analisis terhadap jumlah dan struktur kromosom. Analisis hanya dapat dilakukan pada tahap metafase sehingga perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan sel pada tahap tersebut mengingat panjang siklus sel setiap jenis sel berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh waktu yang optimal untuk mendapatkan MSC pada tahap metafase. Penelitian dilakukan di Laboratorium *stem cell* Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbangkes. Kegiatan diawali dengan isolasi menggunakan teknik flushing pada tulang femur dan tibia mencit. Selanjutnya dilakukan kultur secara *in vitro* dan induksi colcemid 0,25µg/ml selama 8,16 dan 24 jam untuk mendapatkan MSC pada tahap metafase. Larutan KCl dengan konsentrasi 0,075 M dan 0,045M digunakan sebagai larutan hipotonis. Hasil menunjukkan bahwa 16 jam induksi colcemid 0,25µg/ml pada penggunaan larutan KCl 0,075 M memiliki persentase MSC yang berada pada tahap metafase dan dapat dilakukan analisis tertinggi ($p<0,05$). Pada penelitian ini 16 jam induksi colcemid 0,25µg/ml merupakan waktu yang optimal untuk memperoleh tahap metafase pada MSC dari tulang sumsum mencit.

Kata kunci : *mecenchymal stem cell , karyotyping, colcemid*

PENDAHULUAN

Penelitian dasar untuk menggali potensi *stem cell* dan memanfaatkannya pada aplikasi klinik sebagai sel terapi untuk penyakit degeneratif telah meluas. Penggunaan teknologi pada produksi *stem cell* secara *in vitro* dan penyimpanan *stem cell* (*stem cell banking*) untuk menyediakan *stem cell* perlu diimbangi dengan kontrol terhadap stabilitas genetik *stem cell* sebelum digunakan untuk terapi¹. Perlu dilakukan analisis sitogenetik pada *stem cell* sebelum digunakan dalam terapi regeneratif.

Ketidakstabilan genetik tersebut ditunjukkan dengan perubahan kariotipe kromosom *stem cell*. Perubahan tersebut dapat berupa aberasi atau mutasi kromosom yaitu adanya abnormalitas struktur maupun jumlah kromosom². Kromosom merupakan pembawa materi genetik yang sangat penting dalam produksi *stem cell*, sehingga kontrol terhadap kariotipe kromosom *stem cell* pasca kultur yang lama maupun pasca simpan beku perlu dilakukan^{3,4}.

Kariotipe kromosom sel dapat dianalisis secara molekuler dengan menggunakan metode *karyotyping*.⁵ Pada metode *karyotyping*, kariotipe kromosom dapat diklasifikasikan berdasarkan jumlah, ukuran dan bentuk kromosom. Kromosom yang dapat dianalisis adalah kromosom sel pada tahap metafase, karena pada tahap ini kromosom terletak berjajar pada bidang ekuator dan tampak paling jelas sehingga mudah diidentifikasi. Untuk mengidentifikasi dibutuhkan minimal 20 pasang kromosom sehingga perlu dilakukan sinkronisasi untuk memperoleh sejumlah sel yang mengalami mitosis⁶.

Sinkronisasi dapat dilakukan dengan menambahkan colcemid karena zat tersebut dapat menghambat polimerisasi mikrotubulin. Hal ini mengakibatkan mikrotubulin yang berfungsi memindahkan kromosom dari fase metafase menuju anafase terhambat sehingga pembelahan sel tidak terjadi atau sel berhenti di tahap metafase⁷.

Penggunaan colcemid untuk memperoleh sel pada fase metafase dalam sitogenetik sudah umum dilakukan khususnya pada *karyotyping* dari kromosom sel limfosit. Namun untuk mendapatkan sel pada fase metafase yang cukup perlu dilakukan optimasi baik konsentrasi maupun

waktu pemberian colcemid mengingat pada setiap jenis sel memiliki panjang siklus sel yang berbeda-beda⁸.

Menurut Rieder dan Palazzo waktu pemberian colcemid dapat mempengaruhi abnormalitas kromosom dan toksisitas terhadap sel, maka perlu dilakukan optimasi waktu yang optimal untuk memperoleh *mesenchymal stem cell* (MSC) mencit pada fase metafase⁷. Waktu yang dibutuhkan setiap jenis dan sumber sel berbeda-beda sehingga perlu dilakukan optimasi pemberian colcemid pada setiap jenis sel untuk mendapatkan MSC pada fase metafase sehingga dapat dilakukan analisis stabilitas kromosom MSC dari sumsum tulang mencit dengan metode karyotyping. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan waktu yang optimal dalam mendapatkan MSC mencit pada tahap metafase.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell* Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan - Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dari bulan Maret 2013 - Oktober 2013.

Isolasi dan Kultur MSC

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain swiss webster jantan dari laboratorium hewan coba Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (PBTDK) Balitbangkes dengan umur 6-7 minggu sebanyak 10 ekor (berat badan 15-20 gram). Mencit dipelihara dalam kandang kawat dengan pemberian pakan berupa pelet dari PBTDK dan minum secara adlibitum. Mencit yang akan diambil tulang femur dan tibianya diterminasi dengan *cervical dislocation* yang telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Balitbangkes (LB.02.01/5.2/KE/066/2013). Menurut Soleimani dkk. isolasi MSC pada femur mencit dapat dilakukan dengan memotong tiap ujung tulang femur kemudian diflushing dengan spuit 1 ml yang berisi medium DMEM (Sigma.M0894) 20% FBS (Gibco.26140).⁹ Penggantian medium kultur dilakukan setelah *mesenchymal stem cell* (MSC) menempel pada dasar cawan yaitu hari ke 2-3 kultur. Pada penggantian medium, *haematopoietic*

stem cell (HCS) yang ikut terisolasi pada proses *flushing* akan terbuang.

Medium kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah [DMEM *high-glucose* yang disuplementasi dengan fetal bovine serum 20% (FBS, Sigma), natrium bikarbonat 3.7g/l (Sigma), *L-glutamine*, *non-essential amino acids* 1% (Sigma), *mercaptoethanol* 0.1mM (Sigma) dan *gentamicin* 50µg/ml (Sigma)] dan MSC dikultur dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan pada suhu 37°C¹⁰.

Analisis Kromosom (Karyotyping)

Analisis jumlah kromosom *stem cell* dilakukan seperti yang dilakukan oleh Padilla-Nash et al 2006 dengan sedikit modifikasi¹¹. Kultur MSC dilakukan selama 8-10 hari kemudian diinkubasi dengan colcemid hingga konsentrasi akhir mencapai 0,25 µg/ml colcemid (Gibco, Karyomax) selama 8 jam, 16 jam dan 24 jam, masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali (6 flask). MSC yang masih aktif membelah secara mitosis akan terhenti pada tahap metafase dan tidak meneruskan proses pembelahannya setelah pemberian colcemid. Secara morfologi sel yang mengalami mitosis akan berbentuk bulan-bulat bening menempel pada dasar cawan. Pasase dilakukan untuk memperoleh suspensi MSC, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan 1300 rpm selama 10 menit sehingga terpisah pelet dan supernata. Buang supernata, masukkan pelet dalam larutan hipotonis berupa KCl dengan konsentrasi 0,075 M (0,56%) dan 0,045 M (0,35%)

selama 20 menit dalam 37°C. Setelah itu suspensi sel difiksasi dengan memaparkan suspensi sel pada campuran larutan *hypotonic solution* dan *Carnoy solution* (*Methanol* : *acetic acid* = 3:1) kemudian dilakukan sentrifugasi. Fiksasi dilakukan 2-3 kali kemudian diteteskan pada gelas objek, dikeringkan selama 10 menit dan selanjutnya diwarnai dengan Leisman selama 4 menit. Las dan enthelan. Setelah kering preparat ditutup dengan *cover glass*. Analisis kromosom dapat dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 100 dan menggunakan immersion oil¹¹.

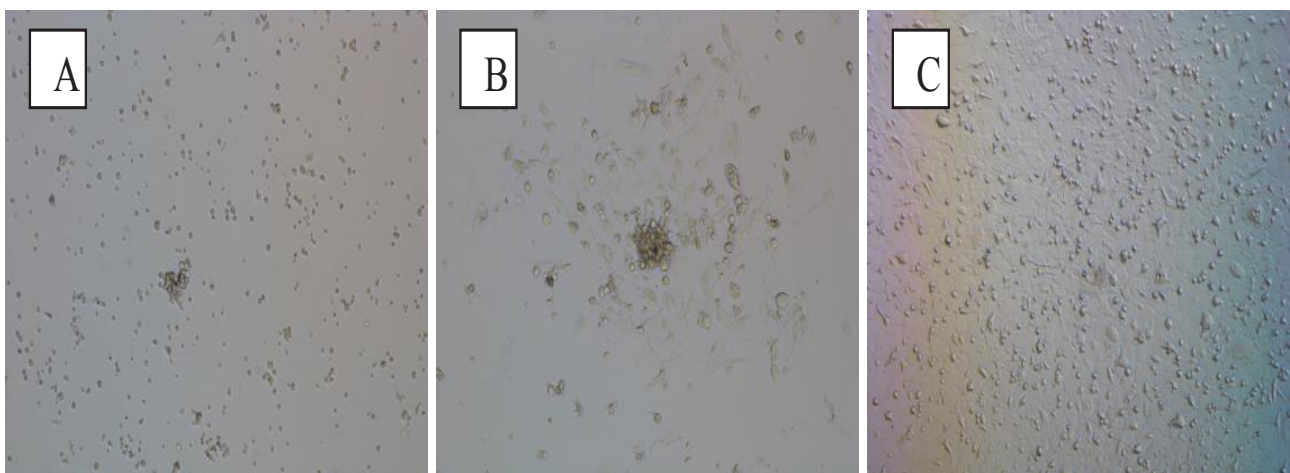
Rencana Pengolahan dan Analisis Data

Data dianalisis menggunakan SPSS 15 menggunakan *two way* ANOVA dengan tingkat kepercayaan $p < 0,05$.

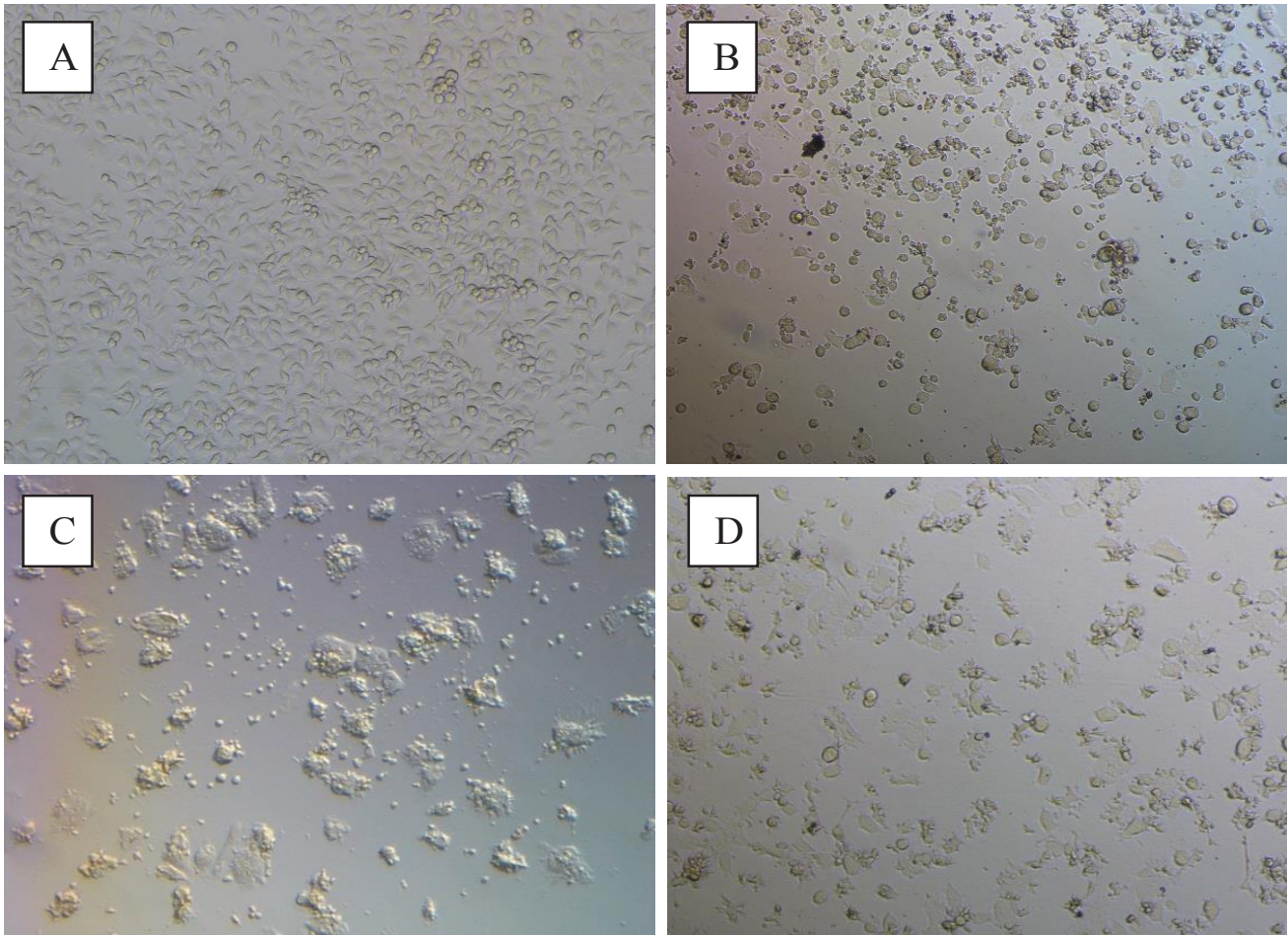
HASIL

Kultur dari sumsum tulang mencit akan diperoleh populasi sel yang heterogen. Pada kultur hari ke 3 dan ke 8 HSC sudah berkurang dan MSC yang menempel sudah mulai mendominasi dasar cawan. MSC yang tumbuh ditunjukkan dengan *morfologi sel fibroblast-like* (Gambar 1).

Mecenchymal Stem Cells (MSC) pada tahap metafase pasca inkubasi dengan colcemid pada 8 jam, 16 jam maupun 24 jam dapat teramati secara mikroskopis. Pada 24 jam inkubasi secara mikroskopis lebih banyak sel yang sudah mengambang/ tidak melekat di dasar flask/cawan (Gambar 2).



Gambar 1. Morfologi MSC secara mikroskopis setelah isolasi dan kultur. (A) hari ke 1 kultur, (B) hari ke 3 kultur dan (C) hari ke 8 kultur.



Gambar 2. Morfologi MSC secara mikroskopis pasca pemberian colcemid 0,25µg/ml. (A) kultur hari ke 8 sebelum pemberian colcemid, (B) 8 jam, (C) 16 jam dan (D) 24 jam inkubasi dengan colcemid.

Mesenchymal stem cell (MSC) yang berhenti pada tahap metafase karena induksi colcemid 0,25µg/ml dapat teramati secara mikroskopis pada setiap perlakuan (Tabel 1).

Tabel 1. Persentase MSC yang dapat mencapai tahap metafase

	0,075 (%)	0,045 M (%)
8 Jam	0,005	0,004
16-17 Jam	0,026	0,003
24-25 Jam	0,007	0,700

Tidak semua MSC pada tahap metafase dapat dilakukan analisis karena penyebaran kromosom sangat menentukan penyusunan urutan kromosom pada proses kariotyping. Pada penelitian ini tidak semua MSC tahap metafase dapat dianalisis (Tabel 2).

Tabel 2. Persentase MSC pada tahap metafase yang dapat dianalisis

	0,075 M (%)	0,045 M (%)
8 Jam	72,38	78,57
16-17 Jam	81,57	69,95
24-25 Jam	75,00	55,40

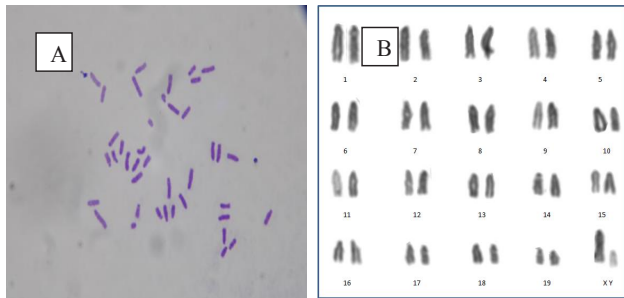
Penentuan kualitas MSC dapat dilakukan berdasarkan stabilitas kromosom dengan batas minimal 20 sel pada tahap metafase yang dapat dianalisis. Induksi colcemid 0,25µg/ml dengan waktu 16 jam merupakan waktu optimal ($p < 0,05$) (Tabel 3).

Tabel 3. Jumlah MSC pada tahap metafase yang dapat dianalisis

Konsentrasi KCl	8 jam	16-17 jam	24-25 jam
0,075 M	7,60 ± 2,07	25,40 ± 3,85*	7,60 ± 3,36
0,045 M	8,80 ± 5,60	7,20 ± 1,79	7,40 ± 1,82

* menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Kromosom dengan penyebaran yang baik (tidak bertumpuk, tidak patah) dapat dianalisis jumlahnya serta dapat disusun berdasarkan besar kromosom. Kariotipe kromosom mencit jantan yang telah disusun sesuai dengan committee on standardized genetic nomenclature for mice (Gambar 3).



Gambar 3. Penyebaran kromosom homolog (A) kariotipe kromosom MSC (B) kromosom mencit jantan.

PEMBAHASAN

Penggunaan Colcemid dan Larutan Hipotonis

Penambahan colcemid dalam metode *karyotyping* merupakan tahapan sebelum dilakukan panen untuk menghambat pembelahan sel di tahap metafase. Selain menggunakan colcemid ada beberapa bahan kimia yang digunakan untuk menghambat polimerasi mikrotubulin seperti *demecolcine* dan *nocodazole*¹². Namun colcemid secara umum telah banyak digunakan untuk *karyotyping* dari kultur limfosit. Pada kultur limfosit manusia pemberian 0,25µg/ml colcemid selama 2 jam dapat digunakan untuk memperoleh sel limfosit di fase metafase dengan jumlah yang cukup, namun Miura dkk. melaporkan bahwa 0,01µg/ml selama 2 jam diperoleh kondisi kromosom kondensasi yang optimal untuk dapat dilakukan analisis¹³. Pada MSC manusia Muntion dkk⁶. melaporkan bahwa 0,05µg/ml selama 15 jam, pada *embryonic stem cell* (ESC) digunakan 0,1/ml selama 3 jam adalah waktu yang optimal untuk memperoleh MSC pada fase metafase dalam jumlah yang cukup sehingga analisis kromosom dapat dilakukan^{6,8}.

Pada penelitian ini dari 10 ekor mencit menunjukkan bahwa MSC mulai menempel pada dasar cawan setelah 3 hari kultur dan telah mencapai 80 % konfluensi setelah 8-10 hari

kultur. Analisis kromosom dilakukan setelah 8-10 hari kultur dan menambahkan colcemid dengan konsentrasi akhir 0,25µg/ml selama 8, 16 dan 24 jam inkubasi. Menurut Achille dkk¹⁴. MSC manusia akan mulai memasuki fase G2/M setelah 27-28 jam kultur, sehingga setelah 1 hari kultur sudah dapat diperoleh sel yang mengalami mitosis, beberapa jurnal melaporkan bahwa penambahan colcemid diberikan setelah 2-3 hari kultur untuk memperoleh sel metafase.

Pada 8 jam dan 24 jam diperoleh rata-rata jumlah MSC pada tahap metafase yang lebih rendah dibandingkan dengan 16 jam inkubasi colcemid dengan konsentrasi yang sama (Tabel 1). Waktu optimal 16 jam pemberian penghambat metafase juga dilaporkan pada ESC dan induced pluripotent *stem cell* (iPS)¹². Rendahnya jumlah sel metafase pada 8 jam pertama dapat terjadi karena masih belum banyak sel yang memasuki fase mitosis. Namun pada 24 jam inkubasi colcemid, MSC yang telah memasuki tahap metafase dan tidak mampu memasuki tahap berikutnya akan mengalami apoptosis atau kematian sel mati. Hal ini juga ditunjukkan secara mikroskopis dengan bertambahnya sel yang tidak menempel pada cawan (Gambar 2). Menurut Rieder dan Palazzo pemberian colcemid pada beberapa jenis *cell line* selama 72 jam dapat mengakibatkan toksisitas terhadap sel dan kematian sel⁷.

Proses kematian sel dapat terjadi karena secara alami sel akan mengalami kematian terprogram (apoptosis) dalam proses eliminasi. Namun ada faktor lain dari luar seperti karena adanya infeksi, respon imun dan bahan kimia yang bersifat toksin. Colcemid merupakan bahan kimia yang bersifat toksin bagi sel, zat ini dapat menghambat polimerisasi mikrotubul sehingga sel tidak mampu menyelesaikan proses mitosis. Pemberian zat tersebut dalam konsentrasi tertentu dan lamanya paparan dapat meningkatkan efek toksin terhadap sel.

Jumlah kromosom metafase dengan penyebaran yang baik dapat dengan mudah dilakukan analisis, karena tidak terjadi penumpukan maupun patahan kromosom. Kualitas penyebaran kromosom menurut Deng dkk. dipengaruhi oleh proses rehidrasi, kecepatan pengeringan pada slide dapat menyebabkan patahan pada lengan

kromosom¹⁵. pada penelitian ini digunakan larutan hipotonis yang berbeda untuk mengetahui larutan yang optimal untuk memecah dinding MSC, dalam karyotyping larutan standar yang digunakan adalah KCl. Penggunaan konsentrasi KCl sebagai larutan hipotonis dalam penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan pada perolehan sel metafase dengan penyebaran kromosom yang baik sehingga kromosom dapat dianalisis berdasarkan ukuran kromosom, kecuali pada 16 jam inkubasi colcemid dengan 0,075 M KCl (Tabel 2 dan 3). Ini menunjukkan bahwa membran inti MSC menciut dapat secara optimal dapat dipecahkan dengan larutan hipotonis KCl 0,075 M. Namun menurut Moralli dkk. penggunaan KCl 0,4% dengan HEPES dapat menghasilkan kromosom metafase yang bertumpuk lebih sedikit dibandingkan tanpa menggunakan buffer dengan konsentrasi KCl yang sama pada human ESC¹². Perbedaan ini dapat disebabkan oleh perbedaan jenis sel atau kualitas pH larutan hipotonik yang digunakan, karena pH larutan hipotonik yang sedikit asam (pH 6,5-6,7) sangat mempengaruhi penyebaran kromosom tahap metafase sehingga kualitas penyebaran kromosom yang lebih rendah¹².

Stabilitas genetik pada MSC

Potensi MSC dalam berproliferasi serta berdiferensiasi dapat digunakan sebagai alternatif dalam aplikasi pengobatan regeneratif, namun terhadap fenotip sel serta kestabilan genetiknya perlu diperhatikan mengingat adanya kemungkinan tumorigenesis pada sel punca yang diekspansi secara *in vitro*. Pada produksi MSC secara *in vitro* dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan perubahan morfologi sel, tingkat proliferasi serta stabilitas kromosom MSC sehingga menurunkan potensi MSC. Menurut Nekanti dkk¹⁶. kultur MSC secara *in vitro* meningkatkan beberapa marker yang menyebabkan transformasi MSC meskipun secara kariotipe kromosom tidak menunjukkan adanya abnormalitas, namun Miura dkk. telah melaporkan bahwa adanya akumulasi instabilitas kromosom pada MSC yang diisolasi dari sumsum tulang murine dapat menyebabkan keganasan¹³.

Pada penelitian ini pada kultur MSC selama 8-10 hari secara fenotip masih memiliki morfologi fibroblast-like (Gambar 1) dan kestabilan kromosom karena tidak menunjukkan

adanya perubahan jumlah kromosom (Gambar 3). Hal ini dikarenakan kultur masih dalam awal pasase sehingga kestabilan genetik masih dapat dipertahankan.. Menurut Zhang dkk. setelah kultur 20 hari kromosom MSC manusia masih menunjukkan kestabilan genetik, namun pada kondisi hipoksia pada pasase ke 13 MSC manusia sudah menunjukkan adanya perubahan struktur kromosom (aberasi kromosom)¹⁷⁻¹⁸. Menurut Uayema dkk. perubahan yang terjadi pada kondisi hipoksia pada kultur MSC secara *in vitro* dapat menyebabkan perubahan jumlah kromosom seperti aneuploidi, poliploidi atau perubahan struktur kromosom seperti adanya delesi, insersi atau translokasi².

Pada MSC dari murine pada pasase ke 27 dan 55 kariotipe MSC telah menunjukkan adanya aberasi kromosom, namun pada MSC manusia mempunyai kestabilan genetik yang lebih baik dibandingkan dari murine¹³. Hal senada juga dilaporkan oleh Izadpanah dkk. bahwa MSC pada manusia pada pasase ke 20 masih menunjukkan stabilitas kromosom namun pada monyet dan tikus pada pasase yang sama telah menunjukkan adanya perubahan jumlah kromosom¹⁸. Bahkan pada MSC tikus telah menunjukkan aberasi jumlah kromosom pada pasase pertama¹⁹. Tetapi menurut Bernardo transformasi MSC dipengaruhi oleh suseptibilitas individu sehingga tidak semua MSC yang diproduksi secara *in vitro* dengan kondisi kultur yang sama dapat mengalami transformasi²⁰.

Pemeriksaan stabilitas genetik pada sel punca masih diperdebatkan sebelum aplikasi menggunakan sel punca mengingat adanya transformasi keganasan pada MSC hanya dilaporkan pada MSC hewan model. Pada manusia MSC yang diperoleh dari sumsum tulang dilaporkan mempunyai kestabilan genetik yang lebih baik dibandingkan MSC dari adiposa.²¹ Menurut Osipova dkk. adanya perubahan kromosom tidak berbahaya ketika digunakan untuk transplantasi kecuali jika ada trisomi pada kromosom 8 yang diduga dapat meningkatkan gen onkogen C-MYC yang berlokasi pada 8q²². Untuk itu guna menjamin keamanan perlu dilakukan analisis terhadap kestabilan genetik sel punca sebelum dimanfaatkan sebagai terapi sel²³.

Kekurangan dalam penelitian ini, analisis

kromosom yang dilakukan hanya berdasarkan jumlah belum melakukan analisis berdasarkan banding pada kromosom. Untuk mengetahui abnormalitas kromosom harus dianalisis pada adanya perubahan jumlah dan struktur kromosom^{2,3,24}. Dengan melakukan banding perubahan struktur seperti delesi, duplikasi, insersi dan translokasi pada struktur kromosom dapat teramati dan perubahan ini sangat menentukan kualitas genetik MSC. Secara umum ada beberapa metode konvensional untuk banding pada kromosom seperti pewarnaan kromosom dengan menggunakan pewarna giemsa (G-banding), R-(reverse), C-(centromer)- dan Q-(quinacrine) banding. Pada G banding pewarnaan menggunakan giemsa sehingga ada interaksi antara DNA dan protein, sedangkan pada R-banding pewarnaan giemsa dilanjutkan dengan denaturasi protein AT pada DNA dan pewarnaan pada regio GC DNA, kedua metode konvensional tersebut lebih umum digunakan pada analisis kromosom mamalia²⁴.

Pada metode konvensional dengan banding kromosom dan analisis dilakukan dibawah mikroskop cahaya sangat membutuhkan tingkat ketelitian dan ketrampilan analisis yang tinggi. Namun ada keunggulan dari metode konvensional ini dibandingkan dengan metode *comprative genomic hibridization* (CGH), dimana adanya abnormalitas kromosom seperti translokasi seimbang dan mosaicism tidak dapat teranalisis oleh CGH namun dapat terdeteksi dengan metode konvensional dan *fluorecence in-situ hibridization* (FISH)^{25,26}.

KESIMPULAN

Waktu yang optimal untuk mendapatkan MSC dari sumsum tulang mencit adalah 16 jam pasca pemberian 0,25µl/ml colcemid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Prof. Dr. Emiliana Tjitra dan Dr. Vivi Lisdawati sebagai pembina Risbikes 2013 dan tim teknis Risbikes 2013 atas masukan dan nasehat selama melakukan penelitian. Teman-teman tim di laboratorium *stem cell* PBTDK Pusat Biomedis dan Teknologi

Dasar Kesehatan, Badan Litbankes, Kementerian Kesehatan, Kepada Dept. Biologi FKUI yang telah membantu jalannya penelitian saya ucapkan terimakasih. Penelitian ini terlaksana atas pendanaan dari Risbikes Badan Litbang Kesehatan Kementerian Kesehatan 2013.

DAFTAR RUJUKAN

1. Diaferia G, Dessi SS, DeBlasio P and Biunno I. Is stem cell chromosomes stability affected by cryopreservation conditions? *Cytotechnology*. 2008; 58: 11-6.
2. Ueyama H., Horibe T., Hinotsu S., Tanaka T., Inoue T., Urushihara H, et al. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic condition. *J. Cell. Mol. Med.* 2012;16 (1):72-82.
3. Zhang Z, Guan L, Zhang K, Wang S, Cao P, Wang Y, et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. *Cell Biology International*. 2007;31:645-8.
4. Ângelo PC, Ferreira AFS, Fonseca VD, Frade SP, Ferreira CS, Malta FCV, et al. Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Genet. Mol. Res.* 2012;11(2):1002-12.
5. Weksberg R., Hughes S., Moldovan L., Bassett AS., Chow EW and Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics*. 2005; 6:180-90.
6. Muntion S., Sanchez-Guijo FM., Carrancio S., Vilaron E., Lopez O., Diez-Campelo M., et al. Optimisation of mesenchymal stromal cells karyotyping analysis: implication for clinical use. *Transfus Med.* 2012;22 (2):122-7.
7. Rieder CL and Palazzo RE. Colcemid and mitotic cycle. *Journal of Cell Science*. 1992;102:387-92.
8. Campos PB., Sartore RC., Abdala SN., and Rehen AK. Chromosomal spread preparation of human embryonic stem cell for karyotyping. *JoVE*. 2009; 31:1-4.
9. Soleimani M and Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cell from mouse bone marrow. *Nature Protocols*. 2009; 4 (1):102-6.

10. Matahine T, Supriatna I, Sajuthi D dan Boediono A. Produksi embryonic stem cells dari Inner cell Mass (ICM) blastosis yang diisolasi dengan metode enzimatik dan immunosurgery. *Jurnal Veteriner*. 2008; 9 (1):13-9.
11. Padilla-Nash H. Barenboim-Stapleton L., Difilippantonio MJ., and Ried T. Spectral karyotyping analysis of human and mouse chromosom. *Natur Protocols*. 2006;1(6):3129-42.
12. Moralli D., Yusuf M., Mandegar MA., Khoja S., Monaco ZL., and Volpi EV. An improved technique for chromosomal analysis of human ES and iPS Cells. *Stem Cell Rev and Rep*. 2011;7: 471-7.
13. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA., Fu B., Patel V., et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cell leads to malignant transformation. *Stem Cell*. 2006;24:1095-103.
14. Achille V, Matelli M., Arrigo G., Novara F., Avanzini MA., Benardo ME. et al. Rita M. Cell-cycle phases and genetic profile of bone marrow-derived meenchymal stromal cells expanded in vitro from healthy donors. *J. Cell. Biochem*. 2011;112:1817-21.
15. Deng W., Tsao SW., Lucas JN., Leung CS and Cheung ALM. A ew method for improving metaphase chromosome spreading. *Cytometry Part A* 51A;2003;46-51.
16. Nekanti U., Dastidar S., Venugopal P., Totey S and Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene ekspression in human Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *Int. J. Biol. Sci*. 2010;6:499-509.
17. Zhang Z, Guan L., Zhang K., Wang S., Cao P., Wang Y., et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. *Cell Biology International*. 2007;31:645-8.
18. Izadpanah R, Kaushai D and Kriedt C. Long-term iv vitro exspansion alter the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008;68:4229-38.
19. Foudah D., Redaeli S., Donzelli E., Bentivegna A., Miloso M., Dalpra L., and Tredici. Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow- derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Research*. 2009;17:1025-39.
20. Bernardo MS., Zalfaroni N and Novara F. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell do not undergo transformation after long term culture and do not exhibit telomerase maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 2007;67:9142-9.
21. Ferreira RJ., Irioda AC., Cunha RC., Fransisco JC., Guarito-Souza LC., Srikanth AVKN. et al. Contraversies about the chromosomal stability of cultivated mesenchymal stem cell; their clinical use is it safe? *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2012;7:356-63.
22. Osipova EY., Shamanskaya TV., Kurakina OA., Nikitina VA., Purbueva BB., Ustugov AY. et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *British Journal of Medicine and Medical Research*. 2011;1(3):85-95.
23. Wang Y., Han Z., and Han Z. Safety of mesenchymal stem cell for clinical application. *Stem Cell International*. 2012; ID 652034:4 pages
24. Bickmore WA. Kariotype Analysis and Chromosome Banding. *Encyclopedia of life sciences*. 2001;1-7.
25. Shaffer LG and Bejjani BA. Using microarray-based molecular cytogenetic methods to identify chromosome abnormalities. *Pediatric Annals* . 2009;38(8):440-7.
26. Dekel-Naftali M., Aviram-Goldring A, Litmanovitch A, Shamash J, Reznik-Wolf H, Laevsky I. et al. Sreening of human pluripotent stem cells using CGH and FISH reveals low-grade mosaic aneuploidy and a recurrent amplification of chromosome 1q.. *European Journal of Human Genetics*. 2012;20:1248-55.