

LAPORAN PENELITIAN

INDUKSI *IN-VITRO* SEL PUNCA MESENKIM DARI TALI PUSAT MANUSIA MENJADI SEL PUNCA LIMBAL



Ketua Pelaksana: dr. Lutfah Rifati, SpM

PUSLITBANG BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI KESEHATAN DASAR BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA JAKARTA, 2012

LAPORAN PENELITIAN

INDUKSI IN-VITRO SEL PUNCA MESENKIM DARI TALI PUSAT MANUSIA MENJADI SEL PUNCA LIMBAL



Ketua Pelaksana: dr. Lutfah Rifati, SpM

Indan Penelinan o	an Pengembanyan Kesebata JSTAKAAN
Tanggal :	17-6-2013
No. Klass :	Ps I

PUSLITBANG BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI KESEHATAN DASAR BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA JAKARTA, 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji hanyalah milik-Mu ya Alloh. Semua usaha ini tak akan memberikan hasil sesuai harapan kami tanpa ridlo-Mu, ya Rahman. Sampai penelitian ini terselesaikan Kau limpahi kami dengan ayat-ayat kauniyah yang tak terbantahkan. Decak kagum, terpesona, dan makin tafakkur kami mempelajari semua kuasa-Mu melalui perjalanan penelitian ini. Diri ini tak lebih agung dari sebutir dzarrah di hadapan-Mu, di haribaan keagungan-Mu, ya Kabir.

Kesediaan dan keikhlasan para subjek untuk ikut serta dalam penelitian tak dapat dibayar dengan harga nomminal sebesar apapun. Selaksa ucapan terima kasih kami sampaikan atas kepercayaan para subjek membantu terlaksananya penelitian ini. Kerjasama pihak kolaborator dan para klinisi dalam preparasi spesimen juga sangat berharga dan ucapan terima kasih juga kami tujukan atas segala kerjasamanya selama ini. Para guru yang telah membimbing dan mendampingi peneliti memberikan kesempatan kepada kami untuk dapat menyumbangkan sedikit saja ilmu kami agar bermanfaat bagi masyarakat yang membutuhkan. Segala hormat dan penghargaan kami sampaikan kepada para guru atas semua dukungan dan petunjuknya hingga penelitian ini terselesaikan.

Rekan sejawat, khususnya anggota tim penelitian yang sangat loyal, rasional, dan kompak memungkinkan kami untuk mendapatkan hasil penelitian yang sangat memuaskan. Berbagai modifikasi dan usulan menjadi bahan diskusi dan pertimbangan yang sangat bermanfaat, sehingga penelitian ini mampu menyumbangkan beberapa informasi baru terkait potensi pemanfaatan sel punca untuk alternatif terapi beberapa penyakit dimasa mendatang. Semoga kerja sama yang sangat baik ini dapat senantiasa kami pelihara, bahkan dapat kami tingkatkan untuk mencapai hasil kerja yang maksimal.

Kepada Kementerian Kesehatan Republik Indonesia yang telah memberikan dana untuk penelitian ini kami ucapkan terima kasih. Kami berusaha memberikan yang terbaik untuk memanfaatkan dana yang diberikan dan kami yakin hasil penelitian ini akan bermanfaat bagi masyarakat.

Bersama kita bisal

Ketua Pelaksana

dr. Lutfah Rifati, SpM

RINGKASAN EKSEKUTIF

Lutfah Rifati. INDUKSI IN-VITRO SEL PUNCA MESENKIM DARI TALI PUSAT MANUSIA MENJADI SEL PUNCA LIMBAL

Saat ini berbagai jenis sel punca dewasa sedang dikembangkan untuk dimanfaatkan sebagai salah satu sumber alternatif terapi sel, terutama pada beberapa penyakit degeneratif. Potensi sel punca mesenkim (SPM) yang bersifat multipoten, yaitu dapat berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel, seperti osteosit, kondrosit, adiposit, dan dalam beberapa penelitian berbasis laboratorium (*in vitro* maupun *in vivo*), SPM dapat berdiferensiasi menjadi sel syaraf, kardiomiosit, hepatosit, dan sel islet pankreas. Sel punca mesenkim dapat diisolasi dari berbagai jaringan dewasa, seperti sumsum tulang, darah tepi, darah dan jel Wharton tali pusat serta membran dan cairan amnion, meskipun dalam jumlah sel yang terbatas.

Kegiatan diawali dengan melakukan isolasi SPM dari jel Wharton tali pusat manusia dengan metode eksplantasi cacahan dan teknik enzimatik terhadap jel Wharton. Sel yang sudah diisolasi selanjutnya dikultur menggunakan medium SPM dan dikarakterisasi dengan pemeriksaan beberapa marker positif CD90, CD105, CD166 dan marker negatif terhadap CD34, CD45 menggunakan Facs Calibur flowcytometry. Pengamatan viabilitas SPM dilakukan berdasarkan pewarnaan trypan blue sebelum dan sesudah kultur. Hasil kultur SPM selanjutnya diinduksi kearah sel punca limbal (SPL) dengan menambahkan conditioned medium pada medium kultur epitel.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolasi SPM dapat dilakukan dengan teknik eksplantasi maupun enzimatik dari jel Wharton tali pusat. Induksi SPM kearah SPL dapat diakukan dengan modifikasi medium kultur dan penambahan conditioned medium. Hasil induksi dapat diamati secara imunohistologi dan imunositologi sedikitnya setelah 4 minggu, dan diharapkan akan terbukti mempunyai karakteristik yang serupa dengan hasil kultivasi SPL yang original.

ABSTRACT

Objectives: Corneal damage due to limbal stem cell (LSC) deficiency could be rehabilitated using allograft LSC. This study tries to produce *in-vitro* limbal stem cell by inducing mesenchymal stem cells (MSCs), which are isolated from Wharton jelly of human umbilical cord.

Methods: Isolated MSCs are cultured and being induced to LCS using limbal fibroblast conditioned medium. Cells characterization is using Facs Calibur flowcytometry and immunohistochemistry. Microscope visualize all cell types morphology. Cell viability is detected by trypan blue dyeing.

Results: The MSCs can be isolated from Wharton jelly of human umbilical cord by explantation and enzymatic methods. Both methods produce heterogenous cells population, morphologically. Limbal fibroblast culture shows homogenous spindle shape cells and being fully confluenced within 13-16 days. Limbal fibroblast conditioned medium is an appropriate niche to induce MSCs to be LSCs.

Conclusion: Mesenchymal stem cell derived from Wharton's jelly can be induced in vitro, leading to LSC. Further experiment to develop the culture cell expansion methods and pre-clinical application (animal model xenotransplantation) is needed.

Key words: Mesenchymal Stem Cell, Wharton's jelly, limbal stem cell.

ABSTRAK

Tujuan: Kerusakan komea akibat defisiensi sel punca limbal (SPL) dapat direhabilitasi dengan menggunakan allograft SPL. Penelitian ini mencoba untuk menginduksi SPL in-vitro dengan menginduksi sel punca mesenkim (SPM), yang diisolasi dari jel Wharton dari tali pusat manusia.

Metode: Sel punca mesenkim dapat diisolasi dari jel Wharton, dengan metode eksplan atau enzimatik. Karakterisasi SPM dan SPL menggunakan flowcytometry Facs Calibur dan imunohistokimia. Mikroskop memvisualisasikan beberapa morfologi sel. Viabilitas sel dideteksi dengan pewamaan trypan blue.

Hasil: MSC dapat diisolasi dari Wharton jelly dari tali pusar manusia oleh explantation dan metode enzimatik. Kedua metode menghasilkan populasi sel dengan morfologi yang heterogen. Hasil kultur fibroblas limbal menunjukkan populasi sel homogen yang berbentuk *spindle* dan menjadi konfluens dalam waktu 13-16 hari. Conditioned medium fibroblas limbal merupakan niche yang tepat untuk menginduksi SPM menjadi SPL.

Kesimpulan: Sel punca mesenkim yang berasal dari Wharton jelly diperkirakan dapat diinduksi secara in vitro, mengarah pada SPL. Percobaan lebih lanjut untuk mengembangkan metode kultur ekspansi sel dan uji pra-klinis (percobaan hewan *xenotransplantation model*) diperlukan.

Kata kunci: Sel punca mesenkim, jel Wharton, sel punca limbal.

SUSUNAN TIM PENELITI

Susunan tim penelitian sesuai SK Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan No. HK. 03.05/III/962/2012.

No	Nama	Keahlian/Kesarjanan	Kedudukan dalam Tim
1	dr. Lutfah Rifati, SpM	Spesialis Mata	Ketua Pelaksana
2	Ratih Rinendyaputri, SKH, MBiomed	Master Biomedik	Peneliti
3	dr. Frans Dany	Dokter Umum	Peneliti
4	drg. Masagus Zainuri, MBiomed	Master Biomedik	Peneliti
5	Ariyani Noviantari, SSi	Biomolekular	Peneliti
6	Rulina Novianti,SSi	Kultur dan Isolasi	Litkayasa
7	Nike Susanti, SSi	Kultur dan Isolasi	Litkayasa
8	Sri Mulyani, ATEM	Adminisitrasi	Staf Administrasi
9	Kelik M. Arifin, SSos	Pengolahan data	Pengolah data
10	dr. Tjahjono DG., SpM(K), PhD	Guru Besar	Konsultan
11	Prof. dr. Jeanne Adiwinata Pawitan, MS, PhD	Guru Besar	Konsultan
12	Prof.drh. Arief Boediono, PhD	Guru Besar	Konsultan
13	Ni Wayan Ariani, SSi	Biomolekular	Litkayasa
14	Silmi, SSi	Biologi	Peneliti
15	Aulia Rizki, SSi	Biomolekular	Litkayasa

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
KATA PENGANTAR	i
RINGKASAN EKSEKUTIF	ii
ABSTRACT	iii
ABSTRAK SUSUNAN TIM PENELITI	Vi
DAFTAR ISI	v vi
DAFTAR GAMBAR	Vii
DAFTAR TABEL	VIII
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
III. TUJUAN DAN MANFAAT	8
IV. HIPOTESIS	9
V. METODE	10
VI. HASIL PENELITIAN DAN	22
VII. PEMBAHASAN	29
VIII. KESIMPULAN DAN SARAN	30
IX. UCAPAN TERIMAKASIH	31
X. DAFTAR KEPUSTAKAAN	32
XI. LAMPIRAN	34
XII. LEMBAR PERSETUJUAN	

DAFTAR GAMBAR

	Gambar	Halaman
1	Epitel kornea, epitel limbal, epitel konjungtiva, dan struktur khusus palisade Vogt di daerah limbus	4
2	llustrasi pembelahan asimetris sel punca yang dikontrol niche	4
3	Skema arah pergerakan dan perubahan sel punca limbal menuju kornea	5
4	Potongan lintang kornea manusia	6
5	Penampang lintang tali pusat dan bagiannya	13
6	Preparasi tali pusat sebelum kultur	22
7	Sel punca mesenkim hari ke-6 (a) dan ke-8 (b), medium DMEM low glucose, HAM F-12, FBS 10%	23
8	Sel punca mesenkim hari ke-11 (a, b, c) dan hari ke 13 (d), medium DMEM low glucose, HAM F-12, FBS 10%	24
9	Sel punca mesenkim hari ke-11 yang terkontaminasi, medium DMEM low glucose, HAMF-12, FBS 10%	24
10	Sel punca mesenkim hari ke-13 (a), dan hari ke 14 (b), medium DMEM high glucose, FBS 20%	24
11	Sel punca mesenkim hari ke-16 (a), dan hari ke 20 (b), medium DMEM high glucose, FBS 20%	25
12	Sel punca mesenkim hari ke-27(a), dan hari ke 30 (b), medium DMEM high glucose, FBS 20%	25
13	Sel punca mesenkim hari ke-34(a), dan hari ke 37 (b), degenerasi sel total hari ke-40 (c), medium DMEM high glucose, FBS 20%	26
14	Sel punca mesenkim hari ke-2 well 1 (a) dan 2 (b), medium DMEM low glucose, HAM F-12, FBS 10%	27
15	Sel punca mesenkim hari ke-10 well 1 (a) dan 2 (b), medium DMEM low alucose. HAM F-12 FBS 10% perbesaran 400x	27

DAFTAR TABEL

Tabel		Halamar	
1	Jumlah sel per ceruk pada pasase kedua menurut komposisi medium kultur.	28	
2	Perbedaan tahapan isolasi metoda eksplan dan enzimatik	29	

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

- 1 SK Kapus Biomedik dan Teknologi Dasar Kesehatan tentan Penelitian
- 2 Izin etik dari Komisi Etik Balitbang Kesehatan
- 3 Naskah penjelasan untuk responden dan atau keluarga
- 4 Fonnulir persetujuan subjek untuk terlibat dalam penelitian

I. PENDAHULUAN

Penyebab kerusakan kornea bermacam-macam, antara lain defisiensi sel punca limbal (DSPL), infeksi dan inflamasi, termasuk trakoma dan ulkus kornea; xeroftalmia, kelainan genetik, trauma mekanis, termal, atau kimiawi; atau reaksi alergi berat, misalnya sindrom Stevens Johnson (SSJ). Pada SSJ yang berat dapat terjadi kerusakan total bagian permukaan mata, termasuk kerusakan epitel komea yang berat, DSPL parsial atau total, dan terbentuknya parut kornea. Selain disebabkan oleh SSJ, DSPL dapat terjadi karena trauma termal atau kimiawi, radiasi pengion dan ultraviolet (UV), krioterapi atau operasi berulang, pemakaian lensa kontak, infeksi mikroba yang luas, pemfigoid sikatrik, dan aniridia, tetapi kadang-kadang idiopatik. Insiden DSPL sampai saat ini tidak diketahui secara pasti (Medical Advisory Secretariat, 2008; Yip dkk, 2007; Whitcher, 2001).

Pada keadaan DSPL, epitel konjungtiva bermigrasi ke komea, atau dikenal dengan proses konjungtivalisasi. Konjungtivalisasi mengakibatkan permukaan komea menebal, iregular, dan tidak stabil, sehingga mudah terjadi kerusakan, ulserasi, parut komea, vaskularisasi, dan kekeruhan komea, bahkan gangguan penglihatan dan kebutaan. Penderita umumnya menunjukkan gejala peradangan berat dan kronis, mata terasa tidak nyaman, fotofobia, mata berair, blefarospasme, serta penurunan visus. (Medical Advisory Secretariat, 2008)

Pada DSPL total/difus, konjungtivalisasi dapat menghalangi axis visual, bahkan sampai menutupi semua bagian komea, sedangkan DSPL parsial/lokal umumnya masih disertai bagian komea yang normal karena sebagian daerah limbus masih sehat dan sel punca limbal (SPL) masih dapat menunjang proses regenerasi epitel komea. Terapi kasus DSPL total akan berhasil jika populasi SPL diperbarui dengan melakukan empat tahap prosedur, yaitu transplantasi otologus konjungtiva-limbal; transplantasi allogenik konjungtiva-limbal, transplantasi allogenik kerato-limbal; dan transplantasi SPL yang sudah diekspansi secara ex-vivo (Medical Advisory Secretariat, 2008).

Transplantasi komea allograft seringkali mengalami kegagalan karena reaksi penolakan imunologis. Transplantasi komea relatif jarang dilakukan di Indonesia karena sangat terbatasnya jumlah donor komea yang tersedia tiap tahunnya, sedangkan jumlah calon penerima donor cenderung bertambah. Transplantasi SPL autograft sering dilakukan terutama pada kasus avulsi pterygium dengan sebagian besar daerah limbus masih normal. Pada kasus DSPL total bilateral perlu donor SPL dari individu yang masih ada kekerabatan sedarah untuk mengurangi kemungkinan imunorejeksi. Keterbatasan sumber donor SPL sedarah menjadi salah satu alasan penelitian ini dilakukan, sehingga

diharapkan dari penelitian ini akan didapatkan alternatif sumber donor SPL dari cell-line non limbal, khususnya sel punca mesenkim (SPM) yang diisolasi dari tali pusat, pengambilan spesimen tidak invasif, meskipun altematif ini masih merupakan sumber donor allogenik. Troyer dan Weiss menyimpulkan bahwa tidak dapat dibuktikan adanya imunorejeksi pada penggunaan SPM dari jel Wharton secara in-vivo dan dapat ditoleransi dengan baik pada transplantasi allogenik (Troyer dan Weiss, 2008).

Pemilihan tali pusat sebagai sumber SPM berdasarkan beberapa pertimbangan, yaitu bahwa SPM fetal tidak memicu konflik terkait masalah etika; memiliki kapasitas ekspansi in-vitro lebih besar dalam waktu lebih singkat yang mungkin berhubungan dengan telomer yang lebih panjang; tampaknya kurang memiliki sifat imunosupresi; kurang mempunyai class II human leukocyte antigens (HLA), tetapi memiliki HLA-G; mengekspresi sitokin yang sedikit berbeda; dibandingkan dengan SPM dewasa (Panno, 2005; Troyer dan Weiss, 2008; Wang dkk, 2004).

Publikasi nasional dan internasional tentang induksi SPM kearah SPL masih sulit ditemukan secara on-line. Meskipun demikian plastisitas SPM yang luas memungkinkan penelitian ini dilaksanakan (Bongso dkk, 2005; Reger dkk, 2008) dan selanjutnya dapat dikembangkan sampai batas yang belum diketahui dengan melakukan modifikasi pada komposisi medium kultur, variasi suhu, jenis matriks (sebagai scaffold), maupun variasi lamanya pengamatan (Bakhs dkk, 2004; Rantam dkk, 2009). Sepanjang pengetahuan peneliti, studi ini merupakan studi pertama yang bermaksud menginduksi SPM dari tali pusat yang bersifat multipoten menjadi SPL yang bersifat oligopoten, sehingga banyak hal yang perlu dieksplorasi untuk mendapatkan pemahaman lebih baik tentang induksi SPL dan untuk mengembangkan teknik serta metode eksperimen in-vitro terkait, sebelum diaplikasikan pada manusia. Ahmad dkk berhasil menginduksi sel punca embrionik manusia (SPE) komersial, menjadi epitel kornea dengan membuat tiruan niche SPL pada kultur in-vitro dan menambahkan komponen matriks ekstraselular untuk coating, yaitu kolagen-IV, atau laminin, atau fibronektin, pada wadah kultur jaringan tempat menumbuhkan SPE yang akan diinduksi (Ahmad, 2007).

Penelitian eksperimental *in vitro* ini diharapkan dapat menghasilkan sebuah prosedur teknik induksi SPM yang diisolasi dari jel Wharton (Kern dkk, 2006; Covas dkk, 2003) tali pusat manusia, menjadi SPL. Selain spesimen jel Wharton, akan diambil juga membran amnion dari plasenta bayi (responden) untuk dipersiapkan sebagai matriks saat dilakukan ekspansi epitel (imbal pada penelitian selanjutnya. Dipilih spesimen bersumber tali pusat sebagai sumber SPM karena meskipun relatif lebih rendah keberhasilan isolasi SPM-nya jika dibandingkan isolasi SPM dari sum-sum tulang dan

jaringan adiposit, tetapi prosedur pengambilan spesimen dari tali pusat relatif tidak invasif dan hanya memanfaatkan spesimen tali pusat yang umumnya akan dibuang setelah plasenta lahir pada proses persalinan.

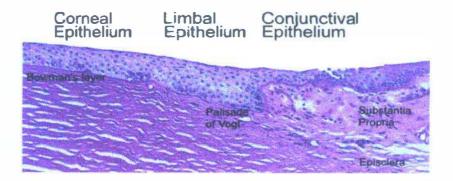
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1.LIMBUS, EPITEL LIMBAL, KONJUNGTIVA, DAN KORNEA

Permukaan mata ditutupi oleh dua lapisan sel yang berbeda, yaitu lapisan epitel komea dan lapisan epitel konjungtiva yang menutupi permukaan sklera. Kedua lapisan epitel ini dipisahkan oleh zona transisional yang disebut daerah limbus, yang berbentuk sirkular sesuai lingkaran luar komea. Epitel komea diperbarui setiap 3-10 hari oleh kumpulan SPL (Medical Advisory Secretariat, 2008; Smolin & Thoft, 2004). Jika terjadi kerusakan SPL total, maka epitel limbal tidak terbentuk dan epitel komea juga tidak terbarui dengan optimal, sehingga fungsi epitel komea lambat laun akan terganggu. Kerusakan SPL akan memicu epitel konjungtiva tumbuh kearah komea (konjungtivalisasi).

Konjungtiva merupakan membran mukoid yang melapisi seluruh permukaan dan bagian dalam palpebra superior dan inferior mata, kecuali daerah komea. Konjungtiva dilapisi epitel skuamosa non keratinisasi, namun pertumbuhan epitelnya tidak bergantung pada ada tidaknya SPL. Epitel konjungtiva bagian apikal mempunyai banyak vesikel dalam sitoplasmanya. Vesikel ini mungkin terbentuk karena proses fagositosis atau eksositosis (Dikutip dari Smolin & Thoft's, 2004). Fungsi utama konjungtiva adalah sebagai penyedia tear film dan dilengkapi dengan zat bakterisida dan virusida untuk melindungi permukaan mata terhadap infeksi (Smolin dan Thoft, 2004).

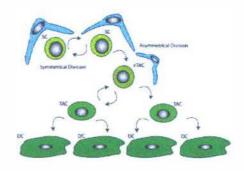
Limbus dihuni oleh satu lapis sel basal limbal yang bergelombang, 7-10 lapis sel skuamosa bertingkat non-keratinisasi yang membentuk epitel limbal, melanosit dan sel Langerhans yang sering tampak diantara sel epitel, serta jaringan penunjang longgar dengan jaringan vaskular sebagai sumber nutrien bagi semua sel diatasnya. Sel apikal epitel limbal mempunyai mikroptika/mikrovilli pada membran apikal. Bagian basal sel basal limbal sebagian tertutup hemidesmosom. Sel basal berbentuk kolumnar yang berukuran sedikit lebih kecil dibandingkan sel basal komea. Sekitar 5-15% sel basal limbal adalah SPL, yang berada terlindung dalam kripti pada Palisade Vogt (Smolin dan Thoft, 2004; Secker dan Daniels, 2009).



Gambar 1. Epitel kornea, epitel limbal, epitel konjungtiva, dan struktur khusus palisade Vogt di daerah limbus. {Diakses dari: http://www.google.com/imgres?hl=en&sa=G&gbv=2&biw=958&bih=496&tbm=isch&tbnid=0rWeJLeVlB7aGM:&imgrefurl=http://www.oculist.net/downaton502/prof/ebook/duanes/pages/v8/ch004/007f.html&docid=1VzTVAjUhOGLPM&imgurl=http://www.oculist.net/downaton502/prof/ebook/duanes/graphics/figures/v8/0040/007f.jpg&w=750&h=300&ei=yolQT82aKlLorQf3rfDgAQ&zoom=1&iact=hc&vpx=179&vpy=237&dur=698&hovh=141&hovw=354&tx=161&ty=83&sig=100832219514451826552&page=1&tbnh=64&tbnw=160&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:1,s:0)

Thoft dkk (1983) mengajukan hipotesis 'The X, Y, Z of comeal epithelial maintenance' yang menyatakan bahwa penjumlahan proliferasi sel basal (X) dan sel yang bermigrasi sentripetal (Y) adalah sama dengan sel epitel permukaan kornea yang hilang, tetapi Thoft dkk tidak dapat menjelaskan bagaimana keterlibatan sel konjungtiva bulbar. Tahun 1989, Sharma dan Coles melaporkan bahwa analisis matematis menunjukkan massa sel epitel komea semata-mata diperbarui oleh SPL.

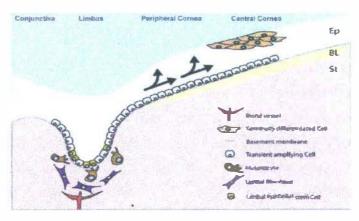
Seperti sel punca lainnya, SPL juga mempunyai karakteristik antara lain: menjadi prekursor yang dapat membentuk sel lain; pembelahan asimetri (satu sel anak transient amplifying cells/TAC yang akhimya berdiferensiasi dan satu sel anak yang tetap menjadi sel punca) untuk self-maintaining populasi SPL (Gambar 2); merupakan bagian kecil dari seluruh populasi sel di daerah limbus; tidak atau lebih lambat berdiferensiasi dibanding sel lain di jaringan yang sama; slow-cycling in-vivo, tetapi mudah dikloning pada kultur sel (Smolin dan Thoft, 2004).



Gambar 2. Ilustrasi pembelahan aslmetris sel punca yang dikontrol $\it niche^{17}$

Eksperimen pertama tentang indikasi adanya sel punca komea di limbus dilakukan oleh Mann (1944) yang mengobservasi pergerakan pigmen (melanin) dari limbus menuju defek pada epitel komea kelinci. Davanger dan Evenson (1971) juga mencatat migrasi sentripetal pigmen dari limbus menuju komea sentral manusia dan menduga bahwa Palisade Vogt (PV) adalah sumber SPL. Huang and Tseng (1991) melaporkan bahwa pengangkatan total limbus menyebabkan fungsi kornea terganggu, neovaskularisasi, dan konjungtivalisasi.¹⁷

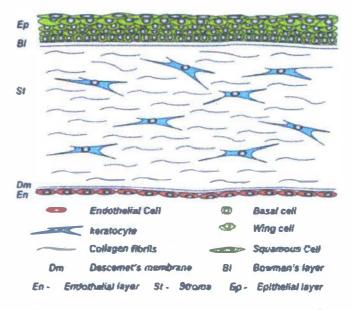
Sel punca mungkin dapat dikenali dengan labelisasi DNA karena slow cycling dan hanya membelah sesekali (Bickenbach, 1981). Dengan asumsi pelabelah dilakukan saat terjadi pembelahan dengan label prekursor DNA seperti tritiated thymidine atau bromodeoxyuridine (BrdU) yang diikuti chase period 8 minggu, maka sel punca akan ditemukan dalam keadaan terlabel. Cotsarelis et al (1989) menemukan sel dengan retensi label seperti itu pada 10% sel basal limbal. Populasi sel tersebut tampaknya lebih primitif karena bentuknya tetap kecil dan bulat (Romano et al., 2003).



Gambar 3. Skema arah pergerakan dan perubahan sel punca limbal menuju kornea¹⁷

Komea terdiri dari 5 lapisan dari luar kedalam, yaitu epitel yang terdiri dari 3 jenis sel; membran Bowman, stroma, membran Descemet, dan endotel. Epitel komea terdiri dari 3-4 lapis sel skuamosa datar non-keratinisasi, 1-3 lapisan sel suprabasal/wing, dan satu lapis sel basal berbentuk kolumnar dan mengalami mitosis (Smolin dan Thoft, 2004). Secara embriologis, epitel komea terbentuk dari permukaan lapisan ektoderma, sedangkan stroma komea dan endotel berasal dari mesenkim (Hoar, 1982; Holden, 1893).

Kornea mempunyai 4 fungsi utama, yaitu melindungi hilangnya cairan dari dalam bola mata; sebagai sawar terhadap patogen; menahan tekanan yang dapat menimbulkan abrasi; dan mencegah kontak bagian intraokular dengan udara luar. Jika terjadi luka pada komea, sel epitel komea akan berusaha menutup perlukaan sesegera mungkin.



Gambar 4. Potongan lintang kornea manusia 17

Epitel komea mengekspresi berbagai macam sitokeratin/keratin yang diberi simbol K. Semua sel komea mengekspresikan K3 dan K12, sedangkan sel basal komea mengekspresi K5 dan K14. Ekspresi K12, 64kD adalah protein spesifik komea. Semua sitokeratin tersebut tidak ditemukan di SPL, begitu pula koneksin (Cx43) yang hanya ditemukan di kornea dan konjungtiva. Stroma komea mengandung banyak protein, yang dikelompokkan dalam 3 kelompok besar, yaitu kolagen, proteoglikan, dan glikoprotein. Proteoglikan spesifik untuk komea adalah keratokan (Smolin dan Thoft, 2004) dan tidak ditemukan pada SPL. Gen PAX6, AC133, K12, dan OCT4 didapatkan pada jaringan konjungtiva, komea, maupun limbal.

Komponen membran basal komea berbeda dengan limbal. Daerah limbal mengandung laminin-1,5 dan rantai α2β2, kolagen tipe IV, rantai α1, α2 dan α5, sedangkan di komea ditemukan rantai α3 dan α5 (Ljubimov dkk, 1995; Tuori dkk, 1996). Schlötzer-Schrehardt dkk, 2007 menemukan bahwa immunolokalisasi laminin rantai γ3 yang konstan, BM40/SPARC dan tenancin C, yang juga ditemukan *co-localise* dengan klaster sel ABCG2/p63/K19-*positive*. Faktor-faktor tersebut mungkin terlibat dalam memelihara potensi *cell stemness* (Schlotzer-Schrehardt dkk, 2007).

Niche limbal bersifat vascular dengan inervasi yang banyak (Lawrenson and Ruskell, 1991), sehingga merupakan sumber nutrien dan *growth factors* untuk SPL, tidak seperti kornea yang avaskular. Fibroblas pada stroma limbal heterogen dand mengekspresi secreted protein acidic and rich of cysteine (SPARC) yang mungkin berperan untuk adhesi SPL (Shimmura dkk, 2006). Nakamura dkk mengidentifikasi populasi sel-sel turunan sumsum tulang yang berlokasi pada stroma limbal setelah

dilakukannya transplantasi *GFP labelled bone marrow cells* pada *nude mice* (Nakamura dkk, 2005). Sel-sel tersebut mungkin saja bermigrasi ke stroma limbal, meskipun fungsi migrasinya masih belum diketahui.

2.2.SEL PUNCA

Sel punca adalah sel khusus yang mempunyai potensi membelah diri dalam waktu yang tidak terbatas dan dapat menghasilkan berbagai jenis sel spesifik. Kemampuan tersebut dikenal sebagai daya plastisitas, seperti halnya sel embrionik fase awal (blastomer). Secara garis besar sel punca dapat berasal dari embrio atau disebut SPE atau dari fetus, jaringan/organ dewasa dan disebut sel punca dewasa (SPD). Sel punca embrionik merupakan sel pluripoten (mampu berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel) yang sangat prospektif untuk terapi berbasis sel dimasa mendatang. Namun demikian pemanfaatan SPE manusia masih terkendala berbagai masalah terkait isu etika karena berasal dari embrio yang merupakan hasil fertilisasi sel telur oleh spermatozoa. Sel punca dewasa yang umum digunakan secara klinis adalah sel punca hematopoietik (SPH) dan SPM yang dapat diisolasi dari berbagai jaringan dewasa (Panno, 2004; Rantam dkk, 2009).

Sel punca mesenkim adalah sel somatik yang dapat diisolasi dari berbagai jaringan dewasa, mempunyai kemampuan memperbarui diri sampai jumlah yang cukup untuk penyembuhan luka atau menggantikan jaringan yang sakit. Karakteristik *in vitro* SPM yang terpenting adalah **kemampuan proliferasi, berkembang dan membelah diri dalam waktu yang tak terbatas dengan fenotipe embrionik** (belum berdiferensiasi). Yang dimaksud fenotipe embrionik meliputi ukuran atau morfologi yang sederhana; perilakunya dalam berinteraksi dan metode melakukan komunikasi dengan sel-sel lain; serta komposisi *glycocalyx* yang menutupi permukaan semua sel dan bervariasi sesuai dengan tahap perkembangan sel punca. The *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of The International Society for Cellular Therapy* menetapkan konsensus tentang kriteria SPM, yaitu setidaknya melekat pada permukaan plastik biakan pada keadaan kultur standar; mengekspresi marker CD105, CD73, dan CD90, tidak mengekspresi CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79α atau CD19 dan molekul permukaan HLA-DR; dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondroblas, dan adiposis pada eksperimen *in vitro*.

Beberapa penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa SPM mempunyai potensi transdiferensiasi karena dapat diinduksi terarah menjadi derivat: endoderma (endotel vaskular), mesoderma (osteoblas, kondroblas, kardiomiosit (Ginard & Ferrer, 2006), sel islet pankreas (Chao dkk, 2008), dan hepatosit (Tsai dkk, 2009), serta ektoderma (mikroglia, sel mirip neuron, dan epitel komea). Penelitian oleh Gu dkk merupakan penelitian dengan menggunakan hewan coba kelinci yang melaporkan bahwa SPM yang diisolasi dari sumsum tulang dapat diarahkan menjadi epitel komea dengan bukti ditemukannya CK3 pada sel epitel komea hasil induksi yang dilakukan ko-kultur dengan SPL, yang diperiksa pada hari pertama sampai ketiga. Ahmad dkk juga telah berhasil membuat replika niche SPL untuk menginduksi SPE menjadi epitel komea. Telah diketahui bahwa niche berperan sangat penting dalam upaya memelihara sel punca, dan hal ini juga berlaku bagi SPL. Komponen matriks ekstraselular kolagen tipe IV sebagai unsur penting dalam niche SPL telah terbukti dapat mengarahkan SPE menjadi epitel kornea, seperti laporan penelitian Ahmad dkk, 2007. Pada penelitian ini metode kultur untuk mendapatkan SPL akan menggunakan metode Ahmad dkk, dengan mengganti SPE dengan SPM yang diisolasi dari tali pusat. Induksi akan dihentikan jika telah didapatkan marker p63⁺/K12⁻/ABCG2⁺ dengan observasi minimal selama 3 minggu dan SPL yang dihasilkan akan dipertahankan agar tidak berdiferensiasi menjadi epitel komea.

Beberapa penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa SPM turunan sumsum tulang dapat diinduksi terarah menjadi derivat ketiga lapisan germinal atau transdiferensiasi (Lee, 2004; Liu, 2007). Derivat endoderma yang dapat dihasilkan dari induksi SPM adalah endotel vaskular; derivat mesoderma meliputi osteosit, kondrosit, adiposit, kardiomiosit, sel islet pankreas, hepatosit, dan hematosit; sedangkan derivat ektoderma yang telah dilaporkan antara lain sel mirip neuron dan epitet kornea pada kelinci. Gu dkk melaporkan bahwa SPM dari sumsum tulang kelinci terbukti berdiferensiasi menuju sel komea secara *in-vivo*, tetapi secara *in-vitro* baru diketahui bahwa marker CK3 yang spesifik untuk kornea dapat diisolasi dari kultur SPM turunan sumsum tulang tersebut (Gu dkk, 2009).

III. TUJUAN DAN MANFAAT

III.1.TUJUAN UMUM

Menghasilkan SPL secara in-vitro dari induksi SPM yang diisolasi dari jel Wharton tali pusat manusia.

III.2. TUJUAN KHUSUS

- 1. Membuat preparasi spesimen dari tali pusat, khususnya dari jel Wharton.
- 2. Mampu melakukan isolasi dan kultur SPM dari spesimen jel Wharton tali pusat.
- Memperoleh karakteristik SPM dan dapat mengidentifikasi antigen permukaan khas SPM pada hasil isolasi yang berupa adherent fibroblastic-like cells secara mikroskopis, SH3(+)/petanda integrin, CD90(+)/,CD105(+)/molekul adesi, CD34(-) /petanda antigen hematopoeitik).
- 4. Mengembangkan prosedur kultur spesifik untuk diferensiasi SPM menjadi SPL secara in-vitro sesuai prosedur Ahmad dkk (2007) dengan membuat tiruan niche SPL menggunakan SPL kadaver.
- Mengidentifikasi petanda/marker SPL, yaitu p63(+), K12 64kD (-), Nodal (-), dan ABCG2+ dari hasil induksi SPM tali pusat.

MANFAAT

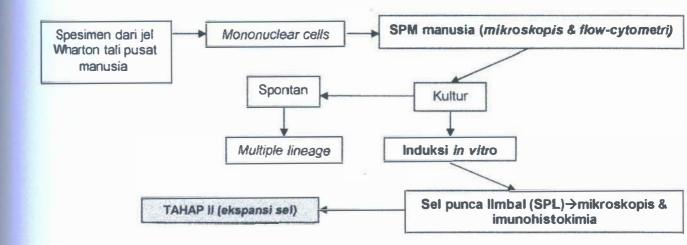
- Mendapatkan metode baru kultur spesifik untuk diferensiasi SPM menjadi SPL secara in-vitro.
- 2. Menyumbangkan informasi terbaru bagi perkembangan ilmu pengetahuan.
- 3. Memberikan altematif sumber donor SPL untuk kasus DSPL dengan konjungtivalisasi luas, yang dikembangkan dari SPM agar dapat dilakukan restorasi dan rehabilitasi visus pasca transplantasi SPL.

N. HIPOTESIS

SPL yang dikembangkan dari SPM tali pusat manusia mempunyai karakteristik serupa dengan SPL original yang diisolasi dari daerah limbus.

V. METODA PENELITIAN

V.1. ALUR PENELITIAN



V.2. Tempat Penelitian

- Isolasi, pasase, karakterisasi, dan identifikasi SPM manusia dilakukan di laboratorium sel punca, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (menggunakan SOP BSL2+).
- Pengembangan dan optimasi kultur spesifik untuk induksi diferensiasi SPM menjadi SPL secara in-vitro dilakukan di laboratorium sel punca, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta di FKH-IPB (menggunakan SOP BSL2+).

V.3. Waktu Pelaksanaan: Tahap I Maret 2012 - Desember 2012 (10 bulan).

V.4. Desain Penelitian

Penelitian merupakan penelitian eksperimental berbasis laboratorium.

V.5. Sampel

Sel punca mesenkim manusia yang diisolasi dari jel Wharton tali pusat bayi baru lahir di RSCM sesuai kebutuhan eksperimen, sampai berhasil didapatkan SPL secara *in vitro*. Spesimen daerah limbus dan kornea (<24 jam pos-mortem) yang tampak normal secara makroskopik.

V.6. Variabel

Variabel independen: komposisi medium, modifikasi matriks, temperatur, dan lama pengamatan.

Variabel dependen: SPL in vitro (marker p63⁺/ K12⁻/Nodal⁻/ABCG2⁺).

V.7. Cara Pengumpulan Data

Data pengamatan hasil intervensi/eksperimen dan setiap langkah eksperimen dicatat dan dilampirkan dalam log book.

V.8. Prosedur kerja

1. Persiapan dan pengambilan bahan/spesimen dari pasien/responden:

- Jel Wharton tali pusat diambil dari tali pusat bayi yang ditolong persalinannya di RSCM dengan izin orang tua/wali responden setelah menandatangani informed consent, termasuk membran amnion plasenta secukupnya.
- Irisan daerah limbus dan kornea kadaver di kamar mayat RSCM (<24 jam posmortem) dengan izin keluarga/wali responden setelah menandatangani informed consent.

2. Langkah Kerja di Ruang Bersalin RSCM

- I. Wali bayi yang baru lahir diminta kesediaannya untuk berpartisipasi dalam penelitian yang dilakukan, dengan cara bersedia memberikan izin untuk pengambilan tali pusat yang umumnya dibuang bersama plasenta dari bayi dibawah perwaliannya.
- Wali diminta mengisi dan menandatangani informed concent setelah isi naskah penjelasan dibacakan oleh dokter yang akan menolong persalinan dan dimengerti oleh orang tua/wali subjek.

.Cara pengambilan spesimen tali pusat:

- 1. Tali pusat (TP) bagian distal dipotong (10-15 cm) dan dicuci dengan NaCl 0,9% steril sampai darah yang tersisa dalam arteri dan vena umbilikal seminimal mungkin.
- 2. Tali pusat direndam dalam larutan povidon iodine 0,5% selama 5-10 menit, lalu bilas kembali dengan NaCl 0,9% sampai bersih.
- 3. Tali pusat yang sudah dibilas dipotong memanjang dengan gunting steril, sehingga bagian dalam tali pusat terekspos PBS dan dimasukkan dalam tabung/botol steril berisi larutan PBS+penstrep 1% (yang sudah dipersiapkan sebelumnya), hingga semua bagian TP terendam.
- Disimpan dalam freezer 4°C sampai dikirim ke laboratorium Balitbangkes (dalam 24 jam post partum) pada hari dan jam kerja (08.00-16.00 wib).

3. Langkah Kerja di Kamar Operasi RSCM

- Subjek yang akan diminta persetujuan tindakan, diberikan penjelasan terkait rencana pengambilan sebagian janngan limbusnya saat operasi avulsi pterygium dengan transplantasi limbus autograf.
- 2. Subjek dipersilakan menandatangani informed consent.

Cara pengambilan spesimen limbus:

- Pada prosedur operasi avulsi pterygium yang disertai transplantasi limbus autograf, saat persiapan autograf diperhitungkan tambahan panjangnya graft limbus sekitar 1-2mm untuk keperluan penelitian ini.
- Limbus sepanjang 1-2mm tersebut segera dimasukkan dalam tabung cryovial steril berisi PBS + penstrep 1% yang telah disediakan.
- 3. Disimpan dalam freezer 4°C sampai dikirim ke laboratorium Balitbangkes (dalam 24 jam pasca operasi) pada hari dan jam kerja (08.00-16.00 wib).

Persiapan Bahan di Laboratorium

Semua bahan yang akan digunakan disiapkan, preparasi medium standar, berbagai senyawa kimia disiapkan di BSC kelas II dalam keadaan steril dengan memperhatikan kaidah *Good Laboratory Practice* (GLP).

4. Urutan Pemeriksaan Laboratorium

Penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian eksperimental multiyears berbasis laboratorium dengan tahapan sebagai berikut:

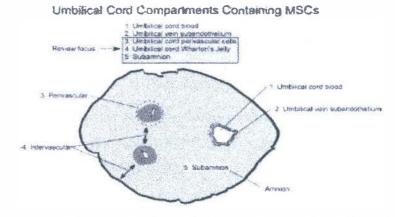
- a. Preparasi dan isolasi SPM dari jel Wharton tali pusat yang telah diuraikan penelitian sebelumnya.
- b. Kultur SPM dari tali pusat dengan medium standar, complete culture medium (CCM).
- Modifikasi prosedur isolasi SPM yang telah diuraikan penelitian sebelumnya.
- d. Karakterisasi dan identifikasi SPM manusia dengan *flow cytometry* menggunakan petanda CD90, CD105, CD166, CD34 dan CD45.
- e. Membuat prosedur kultur eksperimental untuk induksi diferensiasi SPM menjadi SPL secara *in-vitr*o yang merupakan modifikasi antara metode Gu dkk (2009) dan Ahmad dkk (2007).

f. Identifikasi petanda SPL (p63⁺/K12⁻/Nodal⁻/ABCG2⁺) hasil induksi SPM manusia.

V.9. Protokol Pemeriksaan Laboratorium

Prosedur isolasi mononuclear cells dari jel Wharton tali pusat (Wang dkk, 2004)

1. Tali pusat segar direndam dalam HBSS selama 1-24 jam sebelum jeł Wharton diproses. Dilakukan pemisahan sel mesenkim jeł Wharton yang meliputi jaringan penunjang: subamnion, perivaskular, dan intervaskular dari vaskular tali pusat, dilakukan pengerokan jaringan mesenkim dengan skalpel dan ditempatkan pada tabung Falcon, disentrifugasi 250g selama 5 menit pada suhu ruang. Pellet dicuci dengan serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM).



Gambar 5. Penampang lintang tali pusat dan bagiannya (Troyer dan Weiss, 2008)

- 2. Sel disentrifugasi kembali 250g selama 5 menit pada suhu ruang, lalu ditambahkan kolagenase (2mg/ml) selama 16 jam pada 37°C, dicuci dan diberi tripsin 2,5% selama 30 menit pada suhu 37°C dengan agitasi. Selanjutnya sel dicuci dan dikultur dengan DMEM dan ditambahkan 10% fetal bovine serum (FBS) serta glukosa (4.5 g/l) dan disimpan dalam inkubator 37°C pada CO₂ 5%.
- Sel diinapkan semalam agar menempel pada alas botol kultur dan sel yang tidak menempel dibilas dengan PBS, bersamaan dengan penggantian medium keesokan harinya.
- 4. Penggantian medium selanjutnya dilakukan dua kali seminggu.
- Ekspansi medium menggunakan Iscove modified Dulbecco medium (IMDM; Gibco, Grand Island, NY) dan 20% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT) dengan supplemen 10 ng/mL bFGF, 100 U penicillin, 1000 U streptomycin, dan 2 mM Lglutamine (Gibco).

- Derivat single cell SPM didapatkan dari sel yang menempel pada pasase kedua dengan cara dilusi serial, hingga densitas sel mencapai 30 sel/96-well plate dalam medium ekspansi.
- 7. Koloni yang tumbuh selanjutnya dikultur lebih lanjut dan diidentifikasi SPMnya.
- 8. Jika sel aderen sudah mencapai konfluensi 50%-60% dilakukan tripsinasi dan dibilas dua kali dengan *phosphate-buffered saline (PBS; Gibco)* dan disentrifugasi 1000rpm selama 5 menit dan ditanam kembali 1:3 dengan kondisi kultur yang sama.

Penghitungan sel dengan Hemacytometer dan Penilalan Viabilitas dengan Trypan Blue (Bongso dkk, 2004)

- 1. Campur 10 µl suspensi sel dengan 10 µl *trypan blue* 0.4%. Biarkan larutan selama 3-5 menit, suhu kamar.
- Suntikkan 10 µl trypan blue/campuran sel di bawah penutup hemacytometer. Volume
 ini untuk menjamin hemacytometer tidak terisi lebih. Letakkan hemacytometer
 dibawah mikroskop binocular dan atur fokusnya.
- Hitung sel yang tidak berwama (vi able) dan yang berwama biru (non-vi able) pada bujur sangkar lebar di tengah hemacytometer dengan perbesaran lensa 10X. Jika sel total <50, hitung bujur sangkar tambahan sampai jumlah sel 50-100.
- 4. Hitung jumlah total sel yang viable dengan rumus berikut:

Total set hidup = set hidup/jumlah kotak x 2 x 10000 x volume total (dalam mL)

5. Hitung persentase sel hidup dengan rumus berikut:

Jumlah sel hidup

% sel hidup = ----- x 100%

Jumlah sel total

6. Bilas hemacytometer Neubauer dan tutup slide dengan alkohol 70%, lalu keringkan.

Kriopreservasi Mononucleated cells (Bongso dkk, 2004)

Konsentrasi final dimethylsulfoxide (DMSO) 5% dan 11.25% protein (albumin serum human) dalam cRPMI.

- 1. Larutkan kembali MC (dari isolation *Fresh MC*) pada 1 x 10⁷ limfosit hidup/mL, 12.5% HSA dalam medium RPMI 4°C, di dalam tabung falcon 50 mL.
- Tambahkan 2X medium pembeku 4°C secukupnya untuk melipatgandakan volume suspensi sel.

- Tabung segera diletakkan di atas es.Hindari mencampur atau mengagitasi sel.
 Perlahan ambil suspensi sel dengan pipet dan bagikan 1 mL per cryovial di atas es.
- 4. Tempatkan cryovial dalam pre-cooled Mr. Frosty-style freezing container yang sudah diisi isopropanol 70% sesuai instruksi pabrik. Simpan dalam freezing container pada –80°C.

Thawing Mononuclear cells (Bongso dkk, 2004)

Bila mononucleated cells tidak di-thaw dengan benar, maka viabilitas dan pemulihan sel dapat terganggu. Sel mungkin tidak menunjukkan hasil yang baik pada assay fungsional. Secara umum, sel dapat cepat di-thaw, tetapi didilusi perlahan untuk membersihkan DMSO. Sel dengan interkalasi DMSO pada membrannya sangat rapuh dan harus ditangani secara hati-hati.

- Hangatkan cRPMI sampai 22°-37°C pada water bath 37°C sebelum mulai prosedur thawing.
- Pindahkan cryovial dari nitrogen cair ke water bath 37°C. Jika nitrogen cair merember ke dalam cryovial, longgarkan penutupnya, sehingga nitrogen akan keluar pada saat thawing.
- 3. Pegang cryovial di permukaan water bath sambil menyentil ringan saat thawing dalam pengawasan penuh. Thawing (1-2 menit) dan proses yang cepat perlu untuk mempertahankan viabilitas sel. Ketika es pada cryovial hampir habis, segera pindahkan cryovial ke BSC, keringkan dan usap dengan disinfektan sebelum dibuka penutupnya, untuk mencegah kontaminasi.
- 4. Tambahkan cRPMł hangat padasuspensi sel dalam *cryovial* perlahan selama 30 detik. Volume akhir 2 kali volume suspensi sel dan tidak melebihi kapasitas *cryovial*.
- 5. Pindahkan suspensi sel yang sudah diencerkan ditambah 8mL cRPMI hangat untuk setiap isi vial (sekitar 4 vial+ 32mL cRPMI hangat) ke dalam tabung falcon 50 mL.
- Putar sel pada 1200 rpm, selama 7 menit. Buang supematan dan sentil ringan tabung agar pellet terlepas. Larutkan kembali dengan cRPMI hangat sesuai volume yang diinginkan.
- 7. Lakukan penghitungan jumlah sel hidup dengan hematositometer.
- 8. Jika diperlukan konsentrat sel, sentrifus pada 1200 rpm selama 7 menit. Buang supematan dan sentil ringan tabung agar pellet terlepas.
- Encerkan suspensi sel dengan konsentrasi final of 5x10⁶ MC/mL cRPMI media pada suhu kamar.

- 10. Periksa gumpatan dan ambil dengan pipet atau tip.
- 11. Untuk assay cytokine (flow-cytometri dengan Facs-calibur), plate 200 ml/well dalam round-bottom 96-well plate dengan 1x10⁶ sel per well.
- 12. Inkubasi plate yang sudah ditutup pada suhu 37°C selama 12-18 jam untuk istirahatkan sel.

Prosedur kultur SPM (Ahmad dkk, 2007)

of a

- 1. Persiapkan Complete Culture Medium (CCM) yang merupakan campuran dari: 500mL DMEM, 100 mL Fetal Bovine Serum (FBS) dengan konsentrasi ~16,5%, 6mL l-glutamine konsentrasi 2mM, 6mL penicillin G konsentrasi 100 units/mL dan streptomycin sulphate konsentrasi 100µg/mL. Medium difilter melalui unit filter steril 0,22 µm. Dibagi alikuot dan disimpan pada 4°C sampai 2 minggu. Medium harus dihangatkan sampai 37°C setiap kali akan digunakan.
- 2. Sel PBMC tersimpan dilarutkan kembali dalam medium kultur SPM setelah prosedur thawing. Setengah medium diganti tiap dua hari sekali.
- 3. Sel dipanen menggunakan trypsin 0,1% dan EDTA 0,05% dalam 1x PBS dan dilakukan scraping perlahan menggunakan rubber policeman.
- 4. Untuk studi morfologi sel aderen langsung difiksasi pada slide menggunakan paraformaldehida 4%.
- 5. Amati kultur hari ke-2-14, ganti medium pada hari ke-2, 5, 8, 11, 14 dan pindahkan sebagian sel ke petri lain, jika mulai padat (konfluensi 70%).

Prosedur karakterisasi SPM (Bongso dkk, 2004)

Flow-cytometer diaktifkan dan QC sesuai petunjuk manufacturer dan mencakup analisis fluorescent beads untuk validasi fungsi laser, flow systems, dan sistem deteksi. Jika terjadi masalah pada tahap ini harus diperbaiki sebelum pemeriksaan sampel dilakukan.

- Ikuti rekomendasi pabrik tentang antibodi, volume reagen yang sesuai disediakan 6 seri tabung microfuge 1,5-mL (panel) seperti berikut:
 - a) Tabung 1: CD34 PE
 - b) Tabung 2: CD105 PE
 - c) Tabung 3: HLA-Class I: ABC FITC
 - d) Tabung 4: HLA-Class II: DR, DP
 - e) Tabung 5: Isotype control
 - f) Tabung 6: kontrol autofluoresen

Tabung berisi *cocktails* antibodi dapat dibuat sebelumnya dan disimpan dalam gelap pada 4°C, sampai dibutuhkan.

- 3. Sel dipanen dan dihitung serta dinilai viabilitasnya dengan *trypan blue*. Sel ditambah PBS dengan konsentrasi final 1 × 10⁶ sel hidup/mL. Diperlukan 4 × 10⁶ untuk melengkapi protokol.
- 4. Aliquot antara 25 × 10⁴ dan 5 × 10⁵ sel per tabung. Sebagai tambahan siapkan tabung ke-8 yang diisi suspensi sel sebagai kontrol untuk autofluoresen. Vortex untuk mencampur dan inkubasi dalam gelap selama 20 menit pada suhu kamar.
- 5. Cuci sel dengan menambahkan PBS 1,5 mL dan tandai setiap tabung. Putar pada 100 g selama 1 menit pada suhu kamar. Buang supernatan, pellet ditambah 1 mL PBS dan putar ulang kembali sampai 3 kali pencucian.
- 6. Pellet dilarutkan kembali dalam 500 µL PBS dan divortex sampai tidak terdapat agregat.
- 7. Tempatkan suspensi sel pada tabung kultur 12 × 75 mm (alat yang direkomendasikan) dan dianalisis dengan flow cytometer. Analisis tabung 6 terlebih dahulu, dilanjutkan tabung 5 (kontrol isotipe). Hasil pada kedua tabung tersebut digunakan untuk mengatur gates and analysis regions untuk menilai hasil pemeriksaan 4 tabung lainnya.

Analisa terhadap ekpresi antigen permukaan menggunakan FACS Calibur, USA) menggunakan software Cell Quest. Minimal 10.000 sel dianalisa persempel. Tripsinasi MSC di resuspensi menggunakan DMEM 10% FBS dan di cuci dengan PBS 3%FBS. Suspensi MSC diinkubasi dengan antibodi monoklonal dengan konjugat APC untuk marker CD 90 dan PE untuk CD 34.

Labeling SPM dengan BrdU (Ahmad dkk, 2007)

Kultur dengan konfluensi 70% ditambah media yang mengandung 10 µmol/l 5-bromo-20-deoxyuridine (BrdU) selama 24 jam untuk mendapatkan sel yang mengekspresikan BrdU.

- 1. Pada akhir masa inkubasi sel diwamai dengan antibodi terhadap BrdU untuk membuktikan bahwa labeling berhasil.
- 2. Kultur sel pada ruang *slide* difiksasi dengan *ice-cold acetone/methanol* (1:1) pada suhu 20°C selama 30 menit.

- Sesudah diinkubasi dengan HCl 2N pada suhu 20°C selama 30 menit dan dibilas dengan PBS tiga kali, slide diinkubasi semalam dengan antibodi terhadap BrdU yang diencerkan 1:500 pada suhu 4°C.
- 4. Sampel kontrol negatif diinkubasi dalam PBS tanpa antibodi primer.
- Inkubasi dengan antibodi sekunder dilakukan pada suhu 37°C selama 45 menit dan ditambahkan anti-fading mounting medium lalu diperiksa menggunakan mikroskop fluoresens.

Protokol diferensiasi SPM menjadi SPL in-vitro sesuai protokol Ahmad dkk, 2007

Preparasi Media Induksi

- Medium fibroblas dengan fetal calf serum (FCS) 10%, yang terdiri dari DMEM glukosa rendah tanpa piruvat, asam amino non-esensial 1%, penicillin-streptomycin 1%, dan L-glutamine 1%.
- Medium epitel terdin dari DMEM glukosa rendah dengan piruvat tiga bagian, satu bagian medium Ham's F12, FCS 10%, penicillin-streptomycin 1%, hidrokortison, insulin, tri-iodothyronine, adenin, toxin kolera dan epidema (EGF).
- 3. Semua media difilter secara steril dengan filter 0.22µm, disimpan pada 4°C.

Coating of Tissue Culture Plates dengan Komponen Matriks Ekstraselular

- Lyophilized collagen IV dari płasenta manusia ditambahkan asam asetat 0,25% sampai konsentrasi 0,5 mg/ml dan disimpan pada 4°C selama 3 jam dengan pengadukan berkala.
- 2. Ceruk kultur jaringan 2cm² dilapisi dengan kolagen IV dengan cara menuangkan larutan kolagen IV 200µl dan diamkan semalam pada 4°C.
- 3. Keesokan harinya larutan kolagen IV dibilas dengan *phosphate-buffered saline* (PBS) sebelum penanaman kultur sel.

Kultur Epitel Limbal Manusia Menggunakan Komponen Matriks Ekstraselular

- Lapisan paling dalam limbal kadaver dipisahkan, lapisan epitel limbal dipotongpotong seukuran 1mm² dan diinkubasi dengan larutan tripsin 0,05% selama 20 menit dalam inkubator jaringan.
- 2. Suspensi sel yang dihasilkan dipisahkan dari potongan limbal dan ditambahkan medium epitel, disentrifugasi 1000rpm selama 3 menit dan supernatan dibuang.
- 3. Pellet sel ditambah medium epitel lagi.

- Ketiga langkah diatas diulang sampai tiga kali menggunakan jaringan limbal yang sama dan hasil suspensi pellet sel 3 kali proses tripsinasi digabung.
- 5. Tiap 2mm² ceruk kultur jaringan diisi 30.000 sel epitel limbal yang hidup.
- Kokultur epitel limbal dan 3T3 fibroblas mencit (diinaktivasi pada keadaan mitosis dengan cara diinkubasi 2 jam dalam mitomycin C 10 μg/ml) dengan kepadatan 24.000 sel/cm² digunakan sebagai standar baku kultur.
- 7. Semua sediaan kultur disimpan dalam inkubator 37°C pada CO₂ 5%. Penggantian medium dilakukan pada hari ke-3 dan selanjutnya rutin 2 hari sekali.

Isolasi dan Kultur Fibroblas Limbal Manusia

- Jaringan limbal kadaver dipotong-potong seukuran 1mm². Larutan kolagenase IV dalam medium fibroblas tanpa FCS sejumlah 3-mg/ml ditambahkan pada potongan jaringan limbal.
- 2. Campuran tersebut diinkubasi 1 jam dalam inkubator kultur jaringan, lalu larutan kolagenase IV dibuang.
- 3. Tambahkan kembali larutan kolagenase IV dalam medium fibroblas tanpa FCS sejumlah 3-mg/ml pada potongan jaringan limbal dan diinkubasi 8 jam dalam inkubator kultur jaringan.
- 4. Larutan pada langkah ke-3 disentrifugasi pada 1000rpm selama 3 menit setelah jaringan limbal disisihkan.
- 5. Supernatan dibuang dan pellet sel ditambah medium fibroblas yang mengandung FCS 10%.
- 6. Suspensi sel ditempatkan pada ceruk kultur jaringan 2cm² dan diinapkan dalam inkubator kultur jaringan semalam.
- 7. Keesokan harinya kultur fibroblas limbal ditambah medium fibroblas selanjutnya diganti tiap 2-3 hari sekali. Fibroblast limbal diekspansi melalui subkultur sampai 10-15 pasase.

Conditioning Medium Epitel Menggunakan Fibroblas Limbal

- 1. Fibroblas limbal diinaktivasi mitosisnya dengan menambah 10 µg/ml mitomycin C pada medium kultur dan diinkubasi selama 2 jam pada 37°C.
- 2. Fibroblas selanjutnya dicuci 3 kali dengan PBS dan ditempatkan kembali dalam flask kultur dengan kepadatan 56.000 sel hidup/cm2 dan diinapkan dalam inkubator kultur jaringan semalam.

- 3. Keesokan harinya, medium fibroblast dibuang, flask lalu diirigasi dengan PBS, tambahkan 400 µl/cm² medium epitel dan disimpan dalam inkubator kultur jaringan.
- 4. Medium epitel yang sudah dikondisikan dengan fibroblas limbal dikumpulkan setiap hari dan selalu diganti medium epitel segar 400 μl/cm² selama 7 hari, dan disimpan pada -20°C.
- 5. Setelah dikumpulkan selama 7 hari semua medium epitel tersimpan disentrifugasi pada 1000rpm selama 3 menit dan difilter secara steril dengan filter 0,22-µm. Jika disimpan pada 4°C dapat digunakan dalam 1 bulan, sedangkan bila disimpan pada -20°C dapat digunakan maksimum 3 bulan.

Immunocytochemistry untuk Kultur Sel

- Medium pada ceruk kultur jaringan dibuang dan diiri gasi dengan PBS secara berhati-hati dan diinkubasi dengan formaldehida 3,7% dalam PBS selama 30 menit pada suhu kamar.
- PBS tiga kali 5 menit pada suhu kamar, Triton X-100 0,5%, serum domba 2% dalam PBS selama 1 jam pada suhu kamar, dan diluted pri mary antibody dalam PBS diinapkan semalam pada 4°C.
- 3. Keesokan harinya, antibodi primer dibuang dari ceruk kultur lalu dibilas dengan PBS tiga kali selama 5 menit pada suhu kamar. Ceruk diinkubasi dengan 10 µg/ml FITC-conjugated sheep anti-mouse lgs yang diencerkan dalam PBS selama 30 menit pada suhu kamar dan keadaan gelap.
- 4. Setelah antibodi sekunder dibersihkan, ceruk diinkubasi 3 kali dengan PBS selama 5 menit dalam gelap.
- Sel dalam ceruk diinkubasi dengan larutan Hoechst 33342 10 µg/ml dalam air steril selama 10 menit dalam keadaan gelap pada suhu kamar.
- Setelah larutan Hoechst 33342 dibuang, tiap ceruk diinkubasi tiga kali dengan PBS dalam gelap, dan biarkan terisi PBS. Ceruk segera diamati dengan mikroskop inverted dan didokumentasikan.
- 7. Untuk double staining, sel difiksasi, dipermeabilisasi, dan diblok, sebelum diinkubasi dengan antibodi pertama (p63, CK12 64kD, Nodal, atau ABCG2) selama 1 jam. Sel-selnya lalu dicuci dengan FCS 5% dan PBS, lalu diinkubasi dengan antibodi kedua (CK3/12, atau CK10) selama 1 jam.

8. Sel-sel tersebut dicuci kembali dengan FCS 5% dan PBS sebelum penambahan antibodi sekunder (tetramethylrhodamine isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG1, dilusi 1:100; FITC-conjugated anti-mouse IgG2, dilusi 1:100; Rhodamine/FITC-conjugated anti-rabbit IgG, dilusi 1:100; atau Rhodamine-conjugated anti-goat IgG dilusi 1:100 selama 30 menit); selanjutnya sel-sel dicuci sebelum fluorescence microscopy.

V.10 DEFINISI OPERASIONAL

Subjek penelitian adalah bayi baru lahir di RS Cipto Mangunkusumo yang orang tua/walinya bersedia dan mengizinkan spesimen dari tali pusat dan plasenta bayi dimanfaatkan untuk penelitian; serta kadaver yang meninggal <24 jam sebelum pengambilan jaringan dari limbus dan komea, dengan persetujuan keluarga.

V.11. PERTIMBANGAN ETIK

Persetujuan etik untuk subjek penelitian manusia diberikan oleh Komisi Etik Badan Litbangkes (terlampir).

VI. HASIL PENELITIAN

Preparasi tali pusat (TP) di ruang bersalin harus terjaga sterilitasnya. Tali pusat bagian distal dipotong 7-10 cm dan dibilas dengan NaCl 0,9% sampai darah yang tersisa seminimal mungkin. Selanjutnya TP dibelah memanjang dengan gunting steril dan direndam dalam larutan povidon-iodine 0,5% selama 5-10 menit untuk mencegah kontaminasi. Tali pusat dibilas kembali dengan NaCl steril sebelum dimasukkan tabung steril untuk dikirim ke laboratorium sel punca di Labnas lantai 3 Balitbangkes. Semua bagian TP harus terendam PBS dan segera dibawa ke laboratorium dalam 24 jam pasca persalinan (Yudha UGM, 2012).



Gambar 6. Preparasi tali pusat sebelum kultur.

Penelitian eksperimental telah dilaksanakan dengan beberapa modifikasi dengan hasil sebagai berikut:

I. Modifikasi prosedur isolasi SPM dari jel Wharton tali pusat manusia:

Cara isolasi SPM dari jel Wharton (eksplantasi) dan modifikasi medium kultur (modifikasi protokol dari UGM, 2012)

1. Tali pusat dipotong-potong menjadi 1 mm2 dan dibersihkan dari darah dengan medium DMEM low glucose (LG):HAM F-12 (1:1) ditambah 10% FBS atau high

glucose ditambah FBS 20%, lalu ditempatkan pada cawan petri dengan medium sebanyak 1-2cc, sehingga jaringan tali pusat dapat menempel pada *petri dish* dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO₂ diamati keesokan harinya.

2. Amati jaringan eksplan sedikitnya setelah 24 jam, apabila sudah terlihat adanya selsel tumbuh dan melekat pada cawan petri, maka medium ditambah sampai jaringan eksplan tersebut terendam dalam medium.

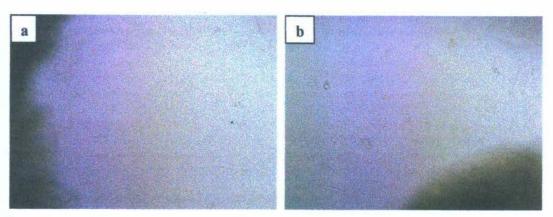
Prepa

konta

II, Wor

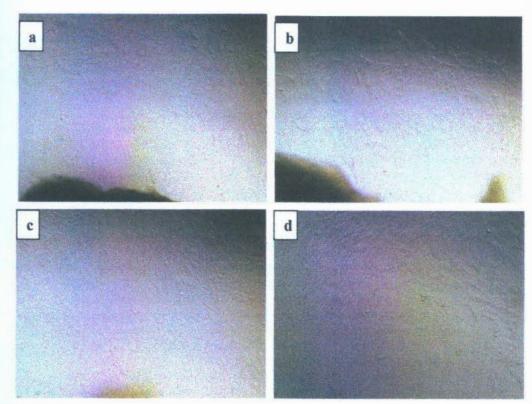
Cara

- 3. Medium diganti dengan medium baru pada hari ke-4 dilanjutkan 3 hari sekali, tetap diamati setiap hari. Apabila sel yang sudah tumbuh di sekitar jaringan eksplan cukup banyak, maka jaringan dapat diambil dan dikultur di cawan petri yang baru dengan metode yang sama. Sel yang menempel dipertahankan sampai berkembang hampir penuh atau konfluensinya 80-90%.
- 4. Pemindahan sel ke media yang baru dilakukan dengan cara menambahkan trypsin 0,05% dan untuk menghentikan aktivitas enzim ditambahkan 0,02% EDTA, dilakukan satu kali dalam seminggu selama dua bulan dan apabila perbanyakan sel mencukupi, sel disimpan dengan cara vitrifikasi dalam larutan nitrogen cair pada suhu -196°C dalam larutan pembeku sel (80% DMEM, 10% DMSO dan 10% FBS).
- 5. Pengamatan dan pencatatan hasil observasi dilakukan sampai diferensiasi spontan.



Gambar 7. Sel punca mesenkim hari ke-6 (a) dan ke-8 (b), medium DMEM *low glu*cose, HAM F-12, FBS 10%.

Gambar 7dan 8 menunjukkan pertumbuhan SPM yang baik dan tidak terkontaminasi, sayang pada beberapa well, seperti tampak pada Gambar 9, kultur sel terkontaminasi pada hari ke-11, sebelum sel dipasase. Kontaminasi ini dapat terjadi karena sterilitas saat melakukan intervensi kultur sel kurang terjaga atau lingkungan laboratorium yang kurang steril, terjadi kondensasi di ruangan laboratorium.



2. An

M

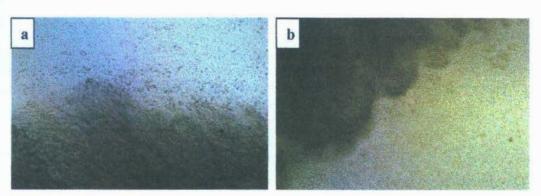
sd

pe

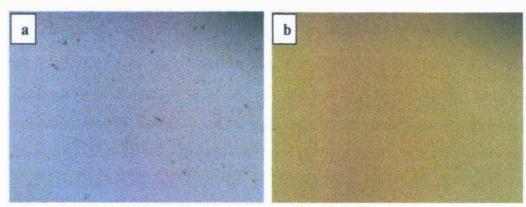
6. P

· kur

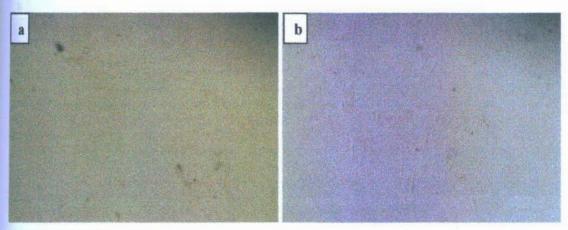
Gambar 8. Sel punca mesenkim hari ke-11 (a, b, c) dan hari ke 13 (d), medium DMEM low glucose, HAM F-12, FBS 10%.



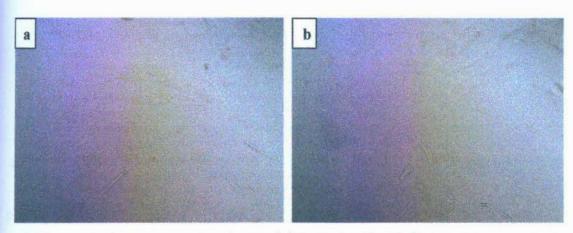
Gambar 9. Sel punca mesenkim hari ke-11 yang terkontaminasi, medium DMEM *low glu*cose, HAM F-12, FBS 10%.



Gambar 10. Sel punca mesenkim hari ke-13 (a), dan hari ke 14 (b), medium DMEM *high glu*cose, FBS 20%.



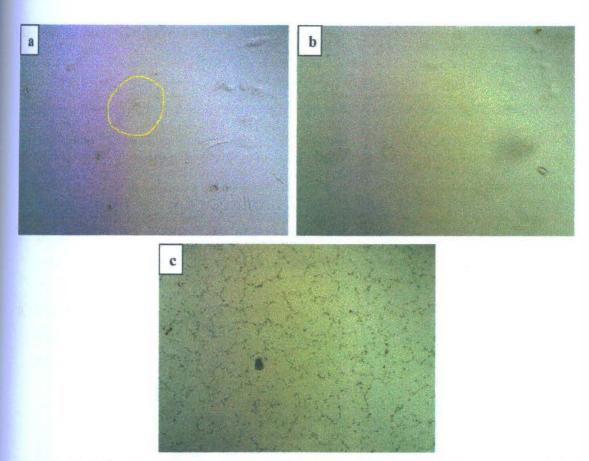
Gambar 11. Sel punca mesenkim hari ke-16 (a), dan hari ke 20 (b), medium DMEM high glucose, FBS 20%.



Gambar 12. Sel punca mesenkim hari ke-27(a), dan hari ke 30 (b), medium DMEM *high* glucose, FBS 20%.

Gambar 10, 11, dan 12 memperlihatkan kultur SPM dengan medium yang berbeda, yaitu DMEM high glucose (HG) ditambah FBS 10%, tanpa HAM F-12. Pertumbuhan SPM terkesan kurang maksimum, tidak terjadi konfluensi seperti yang diharapkan, bahkan sampai waktu 30 hari kultur. Keadaan ini menunjukkan bahwa jenis medium DMEM LG+HAM F-12 merupakan medium yang lebih tepat untuk kultur SPM yang diisolasi dari jel Wharton manusia, dibandingkan DMEM HG yang memberikan hasil pertumbuhan SPM lebih baik pada kultur SPM yang diisolasi dari sum-sum tulang mencit.

Konfluensi sel 80-90% rata-rata terjadi pada hari ke-13 sampai hari ke-15 pasca isolasi dengan kedua metoda. Jumlah sel per ceruk untuk metode eksplan adalah bervariasi 6,7x10⁴ sampai 6,4x10⁵/ml, sedangkan pada metode enzimatik bervariasi antara 2,2x10⁴ sampai 5,9x10⁵, terkesan lebih sedikit dibanding metode eksplan saat pasase pertama.



Gambar 13. Sel punca mesenkim hari ke-34(a), dan hari ke 37 (b), degenerasi sel total hari ke-40 (c), medium DMEM *high glu*cose, FBS 20%.

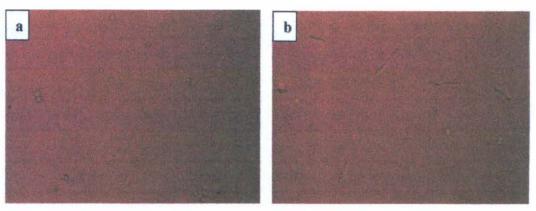
Pada Gambar 13 terlihat SPM berdiferensiasi spontan menyerupai sel saraf dengan beberapa dendrit pada hari ke-34 dan berdegenerasi spontan mulai hari ke-37. Pada hari ke-40 kultur sel menunjukkan degenerasi total dan tampak debris yang bercampur dengan gambaran yang menyerupai kontaminasi.

Medium kultur sangat menentukan berhasil tidaknya pertumbuhan sel seperti yang diharapkan. Pelaksanaan semua kegiatan laboratorium, mulai preparasi spesimen dan medium sampai penggantian medium secara berkala merupakan satu rangkaian kegiatan yang harus dilakukan dengan cermat, steril, dan penuh ketelitian agar mendapatkan hasil yang memuaskan.

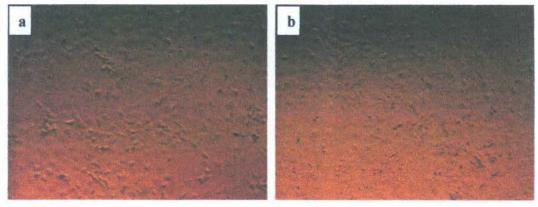
Metode enzimatis isolasi SPM dari jel Wharton (modifikasi UGM, 2012)

- 1. Jaringan tali pusat diambil dari klinik bersalin dengan informed consent yang jelas.
- 2. Jaringan tali pusat yang diperoleh dimasukkan dalam PBS yang mengandung 1% penstrep dan dibawa ke laboratorium.
- Tali pusat dicuci dengan larutan iodin 10 menit untuk menghilangkan kemungkinan adanya kontaminan dan dicuci dengan PBS steril dengan 1000U/ml penicillin dan 1000 μg/ml streptomisin untuk mencuci darah yang ikut terambil.

- 4. Tali pusat dipotong-potong menjadi 1 mm² dan didigesti dengan 0,05% trypsin-EDTA pada 37°C dan digoyang berkala selama 60 menit.
- 5. Aktivitas trypsin dinetralisir dengan menambahkan medium DMEM yang ditambah 10% cairan amnion, dan difilter untuk menghilangkan debris dan disentrifus pada 1500 rpm selama 10 menit.
- Pellet yang terbentuk diambil dan dicuci dua kali dengan DMEM + 10% cairan amnion, 1 mM glutamine, 25 mM NaHCO₃, 1% larutan penicillin-streptomycinantimycotic dan disentrifus 1500 rpm selama 10 menit.
- Supernatan dipisahkan dan pellet ditambah medium dan dikultur kedalam cawan petri setelah dihitung jumlah selnya dan dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
- 8. Medium diganti pada hari ke-2 dan diamati setiap hari. Sel yang tidak melekat dipindahkan ke cawan petri baru, sedangkan sel yang menempel dipertahankan dengan medium sampai sel berkembang penuh atau konfluensinya 90%.



Gambar 9. Sel punca mesenkim hari ke-2 well 1 (a) dan 2 (b), medium DMEM low glucose, HAM F-12, FBS 10%.



Gambar 10. Sel punca mesenkim hari ke-10 well 1 (a) dan 2 (b), medium DMEM low glucose, HAM F-12, FBS 10%, perbesaran 40x.

Metode isolasi SPM enzimatik memberikan hasil sel yang sama baik dengan metode eksplan. Metode ini baru dilakukan akhir Desember 2012 lalu, sehingga belum dapat diamati lebih lanjut pertumbuhan dan perkembangan kultur lebih dari 10 han.

Komposisi medium kultur yang digunakan adalah 1). DMEM *low-glucose*+HAM F-12 (1:1, Gibco®) dibandingkan 2). DMEM *high-glucose*+HAM F-12 (1:1, Gibco®) keduanya ditambah FBS 10% (Gu, 2009; Soleimani, 2009). Perbedaan komposisi DMEM medium 1 dan 2 hanya pada kadar glukosa, yaitu 5,56:25 mM. Uji t sampel bebas digunakan untuk membandingkan rerata jumlah sel pada medium 1 dan 2 pada pasase kedua, batas kemaknaan p=0,05, SPSS 15.0.

Pertumbuhan sel pada medium kultur 1 lebih optimal dibanding medium 2, berdasarkan jumlah sel pada pasase kedua, setelah tiap ceruk diisi 1x10⁴ sel/ml. Jumlah sel pada pasase-2, 4 hari setelah pasase-1 terlihat dalam Tabel 1.

VI B

Tabel 1. Jumlah sel per ceruk pada pasase kedua menurut komposisi medium kultur.

Ceruk/well	Medium Kultur dan Jumlah Sel per mi medium kultur					
	DMEM LG	DMEMHG				
1	514000	22000				
2	181000	283000				
3	67000	56000				
4	240000	78000				
5	641000	42000				
6	192000	593000				
7	336000	131000				
8	453000	278000				

VII. PEMBAHASAN

Isolasi SPM dari jel Wharton tali pusat manusia umumnya dilakukan dengan dua metoda, yaitu metoda eksplan dan enzimatik. Penelitian ini membuktikan bahwa metoda eksplan jauh lebih mudah dilakukan dengan hasil yang baik, dibandingkan metode enzimatik. Tabel 2 menunjukkan perbedaan nyata antara kedua metoda isolasi yang kami gunakan.

Tabel 2. Perbedaan tahapan isolasi metoda eksplan dan enzimatlk

Metoda eksplan	Metoda enzimatik
 Cacahan TP langsung dipindahkan dalam 4-multi-well plate, 1-2 cacahan per ceruk Tambahkan medium kultur 250-300µl per ceruk Inkubasi 18-24 jam pada 37°C, CO₂ 5%, diobservasi lalu tambahkan medium sampai cacahan terendam medium. 	 Cacahan 5-6cm TP ditambah trypsin 0,25% sampai semua cacahan terendam selama 1-2 jam Saring dengan kasa steril rangkap 4, masukkan tabung steril Sentrifugasi 200 G selama 10 menit, supernatan dibuang Tambahkan medium kultur 5ml kedalam pellet Sentrifugasi kembali 200 G selama 10 menit, supernatan dibuang Tambahkan medium kultur 5ml kedalam pellet → suspensi sel Pindahkan suspensi sel 500µl per ceruk

Rerata jumlah sel pada medium 1 lebih tinggi dibanding medium 2 dengan perbandingan 3,3:1,9 (x10⁴), tetapi secara statistik tidak berbeda bermakna, p=0,164 (*independent-samples t-test*). Jumlah sel awal per ceruk adalah 1x10⁴ sel/ml dan menjelang pasase kedua hasil kultur menunjukkan bahwa rerata jumlah sel yang tumbuh pada medium kultur DMEM LG cenderung lebih tinggi dibanding medium DMEM HG, meskipun perbedaan tersebut tidak bermakna secara statistik.

VIII. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- Eksperimen ini berhasil mengembangkan dan memodifikasi prosedur isolasi SPM dari jel Wharton tali pusat manusia menggunakan metode eksplan dan enzimatik dengan hasil sama baik dengan prosedur UGM, 2012.
- Induksi SPM dari jel Wharton kearah SPL belum terlaksana karena beberapa hambatan, seperti masalah penggantian sumber limbus dari kadaver menjadi pasien yang dioperasi avulsi (pengupasan) pterygium dengan transplantasi limbus autograf dan kontaminasi kultur sel berulang.
- Jika nanti berhasil didapatkan conditioned medium limbal manusia dan hasil induksi SPM menunjukkan hasil yang menyerupai SPL original dari manusia, maka eksperimen perlu dilanjutkan dengan penelitian in-vivo dan preklinik agar temuan ini dapat diaplikasikan kepada manusia pada suatu saat nanti sebagai altematif terapi sel untuk mengatasi kebutaan akibat kekeruhan kornea dan defisiensi sel punca limbal.

Saran

Perlu dilakukan eksperimen lebih lanjut untuk mengembangkan metode kultur ekspansi sel dan uji pra-klinis (percobaan hewan xenotransplantation model).

IX. UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Kesehatan yang telah memberikan dana melalui DIPA 2012 untuk penelitian ini. Terima kasih juga ditujukan kepada semua anggota tim penelitian dan para konsultan. Keikhlasan para responden untuk menyumbangkan spesimen dalam penelitian ini juga sangat kami hargai.

b les

X. DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Ahmad S, Stewart R, Yung S, et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Comeal Epithelial-Like Cells by In Vitro Replication of the Comeal Epithelial Stem Cell Niche. Stem Cells 2007;25:1145-55.
- Bongso A, Lee EH. Stem cells: their definition, classification and source. In: Stem cell from bench to bedside. World Scientific Publishing Co: Danvers, 2005;1-13.
- Gu S, Xing C, Han J, Tso MOM, Hong J. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into comeal epithelial cells in vivo and ex vivo. Molecular Vision 2009; 15:99-107.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K.Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells 2006;24:1294-301.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004;103:1669-75.
- Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. Stem Cells 2007;25:750-60.
- Medical Advisory Secretariat. Limbal stem cell transplantation: an evidence-based analysis.

 Ontario Health Technology Assessment Series 2008;8(7):1-58.
- Nakamura, M. Ishikawa, F. Sonoda, K.H. Hisatomi, T. Qiao, H. Yamada, J. Fukata, M. Ishibashi, T. Harada, M. Kinoshita, S. Characterisation and distribution of bone marrow stem cells in the mouse comea. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:497-503.
- Panno, J. Stem cell research: medical applications and ethical controversies. Facts on file Inc.:USA. 2005.
- Smolin and Thoft's. The comea: scientific foundations and clinical practice. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins:Philadelphia. 2005.
- Soleimani, M; Nadri, S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Nature Protocols 2009;4(1):102-6.
- Stem cell exploration. Methods of isolation and culture. 1st ed. Edited by Rantam dkk.

- Airlangga Univ. Press:Surabaya. 2009.
- Thoft, R.A. Friend, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest Ophthalmol Vis Sci 1983;24:1442-3. (Abstrak)
- Troyer, D. L., & Weiss, M. L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells 2008;26:591-9.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem cells 2004, 22:1330-1337.
- Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Comeal blindness: a global perspective. Bulletin of the World Health Organization 2001;79(3):214-21.
- Yip LW, Thong BY, Lim J, et al. Ocular manifestations and complications of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: an Asian series. Allergy 2007: 62: 527-531.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

rectakan Negara No. 23 Jakarta 10560 los 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 428817 Fax (021) 42881754

KEPUTUSAN

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

NOMOR: HK.03.05/III/750/2012

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

ENIMBANG

- bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012:
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 sejumlah tujuh belas penelitian;

ENGINGAT

- : 1. Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);
 - 2. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130):
 - 3. Peraturan Pemerintah Rl No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
 - Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
 - 5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
 - 6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
 - Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.
 - 7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
 - Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.HK.03.05/4/11675/ 2011 tanggal 30 Desember 2011 tentang Penetapan Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji dan Penandatanganan SPM, Bendahara Pengeluaran dan Bendahara Penerimaan pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan di Jakarta tahun anggaran 2012;

MEMPERHATIKAN: 1.

1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2012 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2012, tanggal 9 Desember 2011:



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

M mealainean M mealainean Negara No. 23 Jakarta 10560

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 428817 Fax (021) 42881754

MEMUTUSKAN

VEN	ET	Δ	DI	6	٨	M	
		м		•	м	IW	

ESATU

- 1) Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini
- Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2012, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;

EDUA

- Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 mempunyai tugas sebagai berikut:
 - 1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;
 - 2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

ETIGA

: Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampakan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;

EEMPAT

Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012;

ELIMA

Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2012 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di

: Jakarta

Pada tanggal

6 Februari 2012

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt NIP 19621119 198803 100 1

Tembusan Yth:

- Sekretaris Jenderal Kemenkes RI:
- 2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI
- 3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
- Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
- 5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
- Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
- 9. Kepala Bagian Tata Usaha Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
- Kepala Bidang Biomedis, Puşat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
- 11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.
- Bendaharawan Pengeluaran Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan,

KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

takan Negara No. 23 Jakarta 10560 1226 Jakarta 10012

MEMETAPICA

AUGEN

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 4288174 Fax (021) 42881754

Lampiran 1

Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar

Kesehatan

Nomor

: HK.03.05/III/750/2012

Tanggal : 6 Februari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012 INDUKSI IN-VITRO SEL PUNCA MESENKIM DARI TALI PUSAT MANUSIA MENJADI SEL PUNCA LIMBAL

dr. Lutfah Rifati, SpM

: Peneliti Pertama/Ketua Pelaksana

2. Dr. Tjahjono DG., SpM(K)

Prof.Jeanne Adiwinata Pawitan, M.Si.,PhD

: Peneliti Non Fungsional

: Peneliti Non Fungsional

Prof. drh. Arief Boediono, PhD

: Peneliti Non Fungsional

Ratih Rinendyaputri, S.KH 5.

: Peneliti Non Fungsional

6. dr. Frans Dany

3.

: Peneliti Non Fungsional

7. drg. Masagus Zainuri, M. Biomed : Peneliti Non Fungsional

8. Aryani, S.Si : Peneliti Non Fungsional

9. Silmi, S.Si

Peneliti Non Fungsional

10. Rulina Novianti, S.Si

Pembantu Peneliti

11. Nike Susanti, AMAK

Pembantu Peneliti

12. Ni Wayan Ariyani, S.Si

Pembantu Peneliti

13. Aulia Rizki, S.Si

: Pembantu Peneliti

14. Sri Mulyanl, Atem

: Sekretariat Penelitian

15. Kelik Muhammad Arifin, Sos

: Pengolah Data

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt NIP 19621119 198803 100 1

KEMENTERIAN KESEHATAN RI BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

takan Negara No. 23 Jakarta 10560 1226 Jakarta 10012

MON

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 4288174

(021) 42881754

Lampiran 2

Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi

Dasar Kesehatan

Nomor

HK.03.05/III/750/2012

Tanggal

6 Februari 2012

JUDUL PENELITIAN

Pengolah Data

II. N

14.

15. 1

INDUKSI IN-VITRO SEL PUNCA MESENKIM DARI TALI PUSAT

MANUSIA MENJADI SEL PUNCA LIMBAL

JUMLAH HONOR TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

	Peneliti Pertama	•	Jumlah honor yang diterima per-Jam, per- minggu sebesar	=F	Rp. 35	.000
2	Peneliti Non Fungsional	:	Jumlah honor yang diterima per-Jam, per- sebesar	=F	Rp. 30	.000
3.	Pembantu Peneliti	•	Jumlah honor yang diterima per-Jam, per- minggu sebesar	=F	Rp. 20	.000
4.	Sekretariat Penelitian	:	Jumlah honor yang diterima setiap bulan sebesar	=F	Rp. 300.	.000

Jumlah honor yang diterima per-paket sebesar

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt

=Rp.

1.540.000

NIP 19621119 198803 100 1



KEMENTERIAN KESEHATAN

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: http://www.litbang.depkes.go.id

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor: KE.01.06/EC/ 529 /2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul:

"Induksi In-Vitro Sel Punca Mesenkim Dari Tali Pusat Manusia Menjadi Sel Punca Limbal"

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

dr. Lutfah Rifati, Sp.M.

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 25 Juni 2012

Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan,

rof. Dr. M. Sudomo

NASKAH PENJELASAN

Bapak/Ibu yang mulia, hari ini bapak/ibu diberikan penjelasan dan ditawarkan untuk berpartisipasi dalam suatu penelitian yang berjudul INDUKSI IN-VITRO SEL PUNCA MESENKIM DARI TALI PUSAT MANUSIA MENJADI SEL PUNCA LIMBAL. Peneliti dan tim adalah peneliti dari Pusat Biomedis dan Teknologi Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI bekerjasama dengan para dokter di Departemen Obstetri dan Ginekologi serta Departemen Ilmu Penyakit Mata, FKUI dan FKH-IPB.

Pendahuluan

Kekeruhan kornea dapat mengakibatkan kebutaan. Salah satu penyebab kekeruhan kornea adalah karena defisiensi sel punca limbal (DSPL) yang bersifat parsial maupun total akibat sindrom Stevens Johnson/SSJ, trauma kimia/termal, pemakaian lensa kontak kronis, atau idiopatik. Diperlukan sedikitnya 4 tahap transplantasi untuk memperbaiki DSPL total. Transplantasi kornea relatif jarang dilakukan di Indonesia karena sangat terbatasnya donor kornea yang tersedia tiap tahunnya, sedangkan jumlah calon penerima donor cenderung bertambah.

Penggunaan transplantasi sel punca limbus untuk terapi kornea sudah lama dilakukan dan masih terus dikembangkan untuk mendapatkan hasil terapi yang lebih memuaskan. Sementara itu berkembang pula berbagai teknik untuk membuat sel punca dari *lineage* sel lainnya, seperti dari sel punca mesenkim untuk mengganti epitel kornea yang rusak. Masih sedikit publikasi internasional yang mengungkap hal tersebut dan masih banyak hal yang perlu dieksplorasi untuk mengembangkan teknik dan metode eksperimen *in-vitro* terkait induksi epitel kornea manusia, sebelum diaplikasikan secara klinis. Pengembangan SPM sebagai alternatif terapi untuk mengganti sel punca limbal/SPL cukup menjanjikan mengingat plastisitas SPM yang cukup luas.

Penelitian eksperimental ini merupakan penelitian pertama di Indonesia yang dilakukan untuk mendapatkan prosedur induksi SPM menjadi SPL secara *in vitro* dan merupakan tahap awal pengembangan terapi alternatif penggantian epitel korrnea. Direncanakan sedikitnya dilakukan 3 tahap penelitian terkait pengembangan SPM menjadi SPL, sebelum dapat diaplikasikan secara klinis.

Peran Bapak/Ibu dalam Penelitian ini

Peneliti bermaksud meminta izin bapak/ibu untuk berkenan berpartisipasi dengan cara memberikan izin pengambilan sebagian tali pusat bayi baru lahir dalam perwalian Bapak/Ibu sebagai bahan utama eksperimen yang akan dimanfaatkan semaksimal mungkin, sehingga bapak/ibu/anak yang berpartisipasi dalam penelitian ini telah memberikan sumbangsih yang sangat bermanfaat bagi kemajuan teknologi pengobatan dan keilmuan di Indonesia.

Risiko dan Keuntungan

Pengambilan sebagian tali pusat bayi (10-15 cm bagian distal) tidak ada efek samping bagi bayi yang bersangkutan. Meskipun belum memberikan manfaat langsung bagi para subjek penelitian saat ini, pada akhirnya sumbangan bapak/ibu/anak sangat berharga bagi perbaikan cara pengobatan/ penggantian lapisan epitel kornea dimasa mendatang dan dapat membantu jutaan orang di Indonesia khususnya, dan penderita kebutaan kornea di dunia pada umumnya.

Kerahasiaan dan Hak

Semua informasi atau data yang diperoleh akan dijaga kerahasiannya. Data-data tersebut akan tanpa nama dan akan digunakan kode untuk masing-masing sumber data. Selanjutnya, saya akan merahasiakan nama serta identitas Bapak/lbu/anak dan menyimpannya di Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. Hak Bapak/lbu adalah perhatian utama kami; oleh karena itu partisipasi dalam penelitian ini adalah suka rela dan dapat dihentikan sewaktu-waktu.

Komentar atau Pertanyaan

Jika Bapak/Ibu memerlukan penjelasan lebih lanjut tentang penelitian ini, dapat menghubungi ketua penelitian:

 Dr. Lutfah Rifati, SpM di Badan Litbangkes, Jl. Percetakan Negara No. 23, Jakarta 10560, tel. +62-21-42881762 atau +62-21-70828565 (HP).

Apabila Bapak/lbu memerlukan penjelasan atau ingin mengadukan hal-hal yang berhubungan dengan etik penelitian kesehatan, dapat menghubungi:

Prof. DR. Sudomo
 Komisi Etik Penelitian Kesehatan
 Badan Litbangkes Kemeterian Kesehatan RI
 Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560
 Telepon: (021) 4261088 ext. 106

Email: ke bppk@litbang.depkes.go.id

Informed Consent

PERSETUJUAN SETELAH PENJELASAN

Judul Penelitian: INDUKSI IN-VITRO SEL PUNCA MESENKIM DARI TALI PUSAT MANUSIA MENJADI SEL PUNCA LIMBAL

Penjelasan Singkat Penelitian: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental berbasis laboratorium dengan menggunakan spesimen berupa jel Wharton tali pusat anak dalam perwalian Bapak/Ibu yang biasanya dibuang setelah ari-ari dilepaskan dari bayi yang baru lahir dan sebagian jaringan limbus dan kornea bagian superior jenazah yang meninggal <24 jam. Pada akhir penelitian diharapkan akan didapatkan prosedur induksi sel punca mesenkim yang diisolasi dari jel Wharton tali pusat menjadi sel punca limbal sebagai alternatif pengganti lapisan kornea yang rusak dimasa mendatang.

Peneliti:

Dr. Lutfah Rif'ati, SpM Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI Tel: 021-70828565 Fax: 021-7409102

Email: lulufattah.r@gmail.com

mengizinkan pengambilan spesimen be akan dibuang setelah ari-ari dilahi mendapat penjelasan yang rinci dan memberi izin secara suka rela dan te	tua/wali subjek*) dalam penelitian ini dan bersedia serta erupa sebagian tali pusat (10-15 cm) yang pada umumnya irkan dari bayi baru lahir dalam perwalian saya*) setelah mengerti akan tujuan penelitian ini. Saya berpartisipasi darelah mengerti bahwa saya dapat menolak setiap saat tanpangerti bahwa saat hasil penelitian ini dipublikasikan atau dentitas anak saya akan dirahasiakan.
Tanda tangan: Ortu/Wali ^{*)}	Saksi Nama jelas.
Tanggal	
Peneliti	
Tanggal	
*)Coret yang tidak perlu	

Lampiran 2

Informed Consent

PERSETUJUAN SETELAH PENJELASAN

Judul Penelitian: INDUKSI IN-VITRO SEL PUNCA MESENKIM DARI TALI PUSAT MANUSIA MENJADI SEL PUNCA LIMBAL

Penjelasan Singkat Penelitian: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental berbasis laboratorium dengan menggunakan spesimen berupa jel Wharton tali pusat anak dalam perwalian Bapak/lbu yang biasanya dibuang setelah ari-ari dilepaskan dari bayi yang baru lahir dan sebagian jaringan limbus dan kornea bagian superior jenazah yang menInggal <24 jam. Pada akhir penelitian diharapkan akan didapatkan prosedur induksi sel punca mesenkim yang diisolasi dari jel Wharton tali pusat menjadi sel punca limbal sebagai alternatif pengganti lapisan kornea yang rusak dimasa mendatang.

Peneliti:

Sava

Dr. Lutfah Rif'ati, SpM Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI Tel: 021-70828565 Fax: 021-7409102

Email: lulufattah.r@gmail.com

ouju,									
Setuju untuk terliba	nt sebagai kel	uarga/wali	subjek ^{*)}	dalam	penelitian	ini d	dan b	ersedia	serte
mengizinkan pengar	mbilan spesime	en berupa s	ebagian	jaringa	n Ilmbal d	dan k	ornea	bagian	ates
kedua mata almarh	um/almarhum	ah, setelah	mendapa	at penjel	asan yang	rinci	dan r	neng e rti	akan
tujuan penelitian ini.	Saya berpartisi	pasi dan mei	mberi izin	secara	suka rela	dan te	lah m	engerti b	ahwa
saya dapat menolak	setiap saat ta	npa mendap	oat sanks	і арари	n. Saya m	nenger	ti bah	wa saat	hasi
penelitian ini dipublil dirahasiakan.	kasikan atau d	lipresentasik	an dalan	n semina	ar, maka i	identit	as res	sponden	akan
Tanda tangan: Kelua	rga/Wali ^{*)}	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •			as				
	Tanggal	******							
	Peneliti		* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *						
	Tanggal	*******							
*)Coret yang tidak pe	erlu								

XII. PERSETUJUAN ATASAN

Jakarta, 01 Feb 2013

Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan

Pengusul

\$1-

199

em eug

Per Pul Bac

leT s= DR.Dra. Vivi Lisdawati,Apt NIP. 19681118 199603 2 001 Dr. Lutfah Rifati, SpM NIP. 19690630 200501 2 001

DISETUJUI

PENGENBANGAN RESENATAN

Ketua Panitia Pembina Ilmiah

fly

DR. Drg. Magdarina Agtini NIP. 19501206 198402 2 001 Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Kemkes Ri

> Drs. Ondri Dwi Sampurno, MSi, Apt NIP. 19621119 198803 1 001