

Pengaruh Subpasase dan Starvasi Serum Fibroblas sebagai donor Nukleus pada keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi (Suatu upaya peningkatan efisiensi transfer Nukleus sel somatik dengan teknik IDNI)

B. SISWANTO

*Bagian/KSMF Obstetri dan Ginekologi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Rumah Sakit Umum Saiful Anwar
Malang*

Tujuan: Penelitian ini untuk mempelajari pengaruh subpasase dan starvasi serum fibroblas sebagai donor nukleus pada keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi.

Rancangan/rumusan data: Eksperimen laboratorium. Sel donor yang digunakan adalah fibroblas fetus kambing. Sitoplasma resipien yang digunakan adalah oosit kambing yang dilakukan maturasi in vitro pada tahap metafase II (M-II) yang telah dilakukan enukleasi (Oosit enukleasi).

Bahan dan cara kerja: Dibagi menjadi dua tahap yaitu tahap pendahuluan dan tahap eksperimen. Tahap pendahuluan adalah optimalisasi prosedur TNS teknik IDNI. Tahap eksperimen terdiri dua tahap. Tahap I: Studi pengaruh subpasase (sel donor A) dan kultur starvasi serum (sel donor B) terhadap derajat apoptosis sel donor. Tahap II: Studi pengaruh derajat apoptosis sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil transfer nukleus sel somatik dengan teknik IDNI. Penelitian tahap pendahuluan menunjukkan bahwa teknik IDNI dapat digunakan sebagai metode TNS, melalui integritas sel rekonstruksi, yaitu sitoplasma yang diaspirasi sebanyak 10-25%, tidak ada lisis dan degenerasi. TNS menggunakan sel donor subpasase, dari 72 sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi terjadi 12 (16,67%) pembelahan dan menggunakan sel donor starvasi serum, dari 68 sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi terjadi 7 (10,29%) pembelahan.

Hasil: Penelitian tahap I menunjukkan bahwa subpasase 3 mempunyai persentase sel hidup yang masih baik ($79,55\% \pm 1,72$), apoptosis dini $24,00\% \pm 6,08$ dan apoptosis lanjut $11,67\% \pm 2,08$. Kultur starvasi serum dari subpasase 3 pada hari ke 3 mempunyai persentase sel hidup yang masih baik ($56,1\% \pm 5,94$), mengalami proses apoptosis dini $41,67 \pm 2,08$ dan apoptosis lanjut $42,33\% \pm 7,57$. Analisis statistik menunjukkan bahwa sistem kultur (subpasase dan starvasi serum) mempunyai asosiasi kuat dengan hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor. Penelitian tahap II menunjukkan bahwa dari 125 sel rekonstruksi menggunakan nukleus donor sel donor A terjadi pembelahan sel sebanyak 19 (15,2%) dan terjadi pertumbuhan 4-8 sel dan morula masing-masing ada 3 (0,8%). Dari 118 sel rekonstruksi menggunakan nukleus donor sel donor B terjadi pembelahan sel sebanyak 15 (12,7%), terjadi pertumbuhan 4-8 sel sebanyak 7 (5,93%) dan tidak ada yang mencapai morula. Analisis statistik menunjukkan bahwa derajat apoptosis sel donor (hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut) mempunyai asosiasi kuat dengan perkembangan sel rekonstruksi.

Kesimpulan: Viabilitas dan ukuran kecil (≤ 6 cm) dari sel donor meningkatkan keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2007; 31-3: 155-73]

Kata kunci: subpasase, starvasi serum, sel hidup, apoptosis, pembelahan, pertumbuhan

Objective: The aims of this research is to study the influence of subpassage and serum starvation of fibroblast, as nuclear donor in somatic cell nuclear transfer (SCNT) using intracytoplasmic direct nuclear injection technique (IDNI) for producing reconstructed cells that may be used as materials of stem cell production.

Design/data identification: Research was done using laboratorial experimental design. Donor cell use goat fetal and adult skin fibroblast. Cytoplasm recipient use enucleated oocyte of M-II stage matured in vitro.

Material and methods: Research was divided in two steps i.e. preliminary and experimental. Preliminary study was optimization of SCNT using IDNI technique. The experimental step was consisting of two steps. The first step studies the influence of subculture and serum starvation culture to percentage of life and apoptotic of donor cell. Second step the influence of viability and apoptotic cell to development of reconstructed cells produced by IDNI technique of SCNT.

Results: Preliminary step of research showed that IDNI can be used as technique of SCNT via production of integrated reconstructed cells i.e. aspirated cytoplasm is 10-25%, no lyses and no degeneration. SCNT using subculture and serum starvation cell as nuclear donor showed that 12 (16.67%) of 72 activated reconstructed cells and 7 (10.29%) of 68 activated reconstructed cells have cleaved. Results of first step showed that third sub passage still have good percentage of life cells ($79.55\% \pm 1.72$), late apoptotic was $11.67\% \pm 2.08$ and early apoptotic was $24.00\% \pm 6.08$. Serum starvation culture of third sub passage still have good percentage of life cells at third day ($56.1\% \pm 5.94$), late apoptotic cell was $42.33\% \pm 7.57$ and early apoptotic was 41.67 ± 2.08 . Statistical analysis showed that culture system (subculture and serum starvation) has strong association with life, early apoptotic and late apoptotic donor cells. Second step of research showed that 19 (15.2%) of 125 reconstructed cells using donor cell A have cleaved and 3 (0.8%) of 125 reconstructed cells using donor cell A was growth to 4-8 cell stage and morula. There are 15 (12.7%) of 118 reconstructed cells using donor cell B cleave. There are 7 (5.93%) of 118 reconstructed cells using donor cell B grow to 4-8 cell stage and there are no cell grow to morula. Statistical analysis showed that donor cell characteristic (life and death, early apoptotic and late apoptotic) have strong association with cleavage and growth of cell reconstruction.

Conclusion: All viability and cell size (≤ 6 cm) improve growth and development of reconstructed cell.

[Indones J Obstet Gynecol 2007; 31-3: 155-73]

Keywords: subculture, serum starvation, life cell, apoptotic, cleavage, growth

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Setiap makhluk biologi (makhluk hidup), termasuk manusia sering mempunyai usia kehidupan lebih pendek dari rentang kehidupan (*life span*). Rentang kehidupan merupakan umur biologis maksimal yang bisa dicapai spesies tertentu. Rentang kehidupan adalah tetap (*fixed*) untuk masing-masing spesies.¹ Idealnya, kehidupan manusia bila ditinjau dari segi kesehatan, mempunyai usia harapan hidup (*life expectancy*) panjang (mendekati atau sama dengan rentang kehidupan) disertai mempunyai kualitas hidup yang optimal. Penyebab dari memendeknya harapan hidup dibanding dengan rentang kehidupan didominasi oleh (1) Faktor genetik; (2) Adanya kerusakan sel yang disebabkan oleh proses penuaan; (3) Faktor lingkungan dan (4) Faktor perilaku (*Life style*).¹

Selama ini upaya kesehatan difokuskan untuk menangani penyakit kronis yang mematikan (fatal). Dengan bertambah panjangnya harapan hidup, dalam dekade terakhir, mulai diperhatikan upaya penanggulangan penyakit-penyakit degeneratif akibat kerusakan sel pada proses penuaan. Penyakit-penyakit ini tidak fatal tetapi menurunkan kualitas hidup, contohnya adalah penyakit Alzheimer's, osteoporosis dan lain-lain.¹ Dengan demikian fokus perhatian meluas ke segala penyakit yang tidak saja mematikan namun juga penyakit yang menurunkan kualitas hidup.

Respon dari tubuh manusia sebagai makhluk tingkat tinggi, dalam menghadapi kerusakan sel atau hilangnya sel akibat jejas, berbeda dengan proses dari spesies hewan multiseluler lain. Sebagai contoh, amfibi dapat mengembalikan sel yang telah terdiferensiasi yang mengalami kerusakan menjadi ke keadaan primitif untuk memulihkan jaringan yang hilang (dediferensiasi). Kemampuan membuat bagian tubuh yang hilang ini sudah tidak ada lagi pada manusia atau filum tingkat tinggi dalam metazoa lainnya. Namun demikian, pada manusia dan mamalia lainnya, untuk mengatasi kerusakan sel, masih ada cadangan populasi sel (*stem cell*) untuk membuat sel jenis tertentu dalam satu jaringan apabila dibutuhkan. *Stem cell* spesifik dari organ tertentu berperan dalam penggantian sel secara kontinu pada individu dewasa normal.^{2,3}

Kemajuan penelitian *stem cell* yang terjadi akhir-akhir ini akan membawa perubahan bermakna dalam praktek kedokteran. Banyak penyakit yang disebabkan oleh disfungsi atau kematian dari satu atau beberapa jenis sel, misalnya penyakit Parkinson dan Diabetes Mellitus *juvenile*. Pada penyakit

demikian, terapi penggantian sel dengan memakai *stem cell* memberikan kemungkinan penyembuhan jangka panjang. *Stem cell* embrionik (SE) terbukti dapat transdiferensiasi ke jaringan lain. Dengan demikian, produksi SE dengan metode TNS (Transfer Nukleus Sel Somatik) membuka kesempatan untuk terapi penggantian sel dalam kedokteran regeneratif menjadi kenyataan.^{2,3}

SE pertama dihasilkan dari embrio *mouse* (mencit) oleh ilmuwan-ilmuwan Cambridge dari Inggris. Teknik yang mereka kembangkan kemudian diadopsi oleh James Thomson dari *University of Wisconsin* untuk menghasilkan SE pertama kali pada manusia tahun 1998. SE adalah prekursor semua sel dalam tubuh. Ilmuwan sekarang mulai mencoba bagaimana mengarahkan diferensiasi SE menjadi jenis sel atau jaringan yang diinginkan.² Dengan adanya hESC (*human embryonic stem cell*), terbuka kesempatan luas untuk dapat digunakan mengefektifkan upaya kesehatan. Transplantasi hESC berpotensi untuk memperbaiki fungsi jaringan yang mengalami disfungsi atau rusak akibat berbagai macam penyakit.⁴

Untuk sampai pada tahapan aplikasi klinis terapi penggantian sel, masih diperlukan banyak penelitian tentang *stem cell*. Hal-hal yang menjadi masalah antara lain masalah rejeksi tubuh terhadap SE, terjadinya tumor teratoma atau diferensiasi sel ke arah yang tidak diinginkan.^{4,5} Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah terapi penggantian sel, khususnya barrier imunologis berupa rejeksi tubuh adalah teknologi transfer nukleus (TN). TN kemungkinan dapat dipakai untuk memproduksi SE dari blastosis hasil TN. SE dari hasil TN ini dapat diarahkan/diinduksi menjadi tipe sel tertentu yang dibutuhkan untuk terapi penggantian sel (terapi sel *graft* dari otologus).

Nilai penting dari penelitian ini adalah bahwa apabila nantinya dapat berhasil diproduksi *graft* berupa sel *graft* dengan metode TN, maka sel *graft* tersebut merupakan *graft* yang sesuai (*match*) terhadap pasien sehingga dapat mencegah rejeksi tubuh dan tidak lagi memerlukan imunosupresi. Namun hal tersebut saat ini masih dalam status tahap penelitian. Dalam rangka untuk penyediaan sumber sel untuk terapi, penelitian tidak dapat secara langsung dilakukan pada embrio manusia.⁶⁻⁹ Karena itu penelitian ini merupakan penelitian laboratorium tentang TN yang menggunakan model hewan coba.

Produksi *stem cell* melalui TNS masih ada masalah. Masalah utamanya adalah efisiensi TNS yang masih rendah (Inefisiensi). Penyebab dari inefisiensi TNS terutama adalah disebabkan oleh *reprogramming* nukleus somatik yang diinsersikan ke

dalam sitoplasma dalam TNS yang masih rendah.¹⁰ *Reprogramming* nukleus somatik, yaitu perubahan sel somatik yang telah terdiferensiasi menjadi sel yang totipoten kembali, diperlukan oleh sel rekonstruksi hasil TNS untuk dapat membelah dan tumbuh normal. Indikator dari *reprogramming* yang normal dapat diketahui dengan *marker* pluripotensi sel yaitu adanya ekspresi oct-4 dan GCAP (*Germ Cell Alkaline Phosphatase*) dari mRNA (*messenger ribonucleic acid*) yang merupakan *marker* pluripotensi dari sel manusia dan mencit.¹¹ Keberhasilan *reprogramming* sel somatik juga bisa dinilai dari keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi berikutnya.¹² Dengan demikian, mengetahui faktor-faktor yang berpengaruh pada keberhasilan TNS, sangatlah penting untuk meningkatkan efisiensi TNS, khususnya yang terkait dengan preparasi dan produksi sel donor.

Masalah

TNS adalah menginsersikan sebuah nukleus dari sel somatik ke ruang perivitellin sebuah sel telur yang kromosomnya telah dihilangkan (oosit enukleasi) selanjutnya difusi, dan dihasilkan sel rekonstruksi untuk ditumbuhkan *in vitro* sampai stadium blastosis.

Inseri sel donor ke dalam ruang perivitellin oosit enukleasi, dapat dilakukan dengan *micro movement* (*Piezoelectric impact Drive Mechanism*) dan selanjutnya fusi sel dilakukan dengan memberi aliran listrik.¹³ Diharapkan, perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS adalah terbentuknya sel rekonstruksi dengan *genome* yang fungsional. Hal ini berarti akan terjadi pembentukan satu struktur kromatin yang mampu melakukan transkripsi dan translasi, sehingga memungkinkan adanya ekspresi gen pada sel yang mampu mengalami diferensiasi di tempat dan dalam waktu yang tepat. Salah satu tantangan dari sel rekonstruksi hasil TN adalah menekan ekspresi somatik dan mengaktifkan ekspresi sel embrionik secara tepat. Walaupun pola metilasi dan ekspresi gen sel somatik ada yang masih bekerja, banyak sel rekonstruksi hasil TN yang dapat berkembang sampai blastosis. Salah satu faktor yang menentukan variasi ekspresi gen dan pola metilasi sel rekonstruksi hasil TN adalah sel sumber nukleus donor.¹⁴

Sebelum dipakai sebagai sumber nukleus dalam TNS, sel donor perlu dilakukan subpasase untuk meningkatkan keberhasilan TN. Dalam subpasase, sel yang mempunyai kualitas jelek tidak tumbuh. Sel yang mempunyai kualitas baik dapat tumbuh normal.¹⁵ Dengan demikian subpasase mempunyai fungsi seleksi sel yaitu hanya sel-sel yang baik saja

yang dapat tumbuh untuk selanjutnya dipakai sebagai sumber nukleus donor dalam TNS. Selain fungsi seleksi, subpasase juga mempunyai fungsi untuk memperbanyak ketersediaan (jumlah) sel. Dengan subpasase, beberapa sel donor dapat diperbanyak jumlahnya berlipat ganda. Selain subpasase, sebelum dipakai sebagai sumber nukleus dalam TNS, sel donor juga perlu dilakukan kultur starvasi serum untuk menginduksi sel donor menjadi sel *quiescent* (sel fase G0/G1). Sel donor fase G0/G1 dapat meningkatkan angka keberhasilan TNS.¹⁶⁻¹⁹

Selama ini kultur sel donor mempengaruhi kualitas sel. Jumlah subpasase dan lama kultur sering menyebabkan perubahan-perubahan genetik dan perubahan proses fisiologi sel. Penelitian ini ingin mempelajari masalah apoptosis yang ditimbulkan karena subpasase dan starvasi serum sel donor, selanjutnya mempelajari pengaruh derajat apoptosis pada perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik insersi nukleus langsung ke intrasitoplasma (IDNI = *intracytoplasmic direct nuclear injection*). Masalah yang ingin diketahui dalam penelitian TN menggunakan sel somatik fibroblas sebagai nukleus donor ini adalah:

- Apakah pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus pada derajat apoptosis sel donor.
- Apakah pengaruh derajat apoptosis sel donor nukleus pada perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.
Secara spesifik, masalah penelitian adalah:
- Apakah pengaruh jumlah subpasase sel donor nukleus pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
- Apakah pengaruh hari (lamanya) starvasi serum sel donor nukleus pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
- Apakah pengaruh derajat apoptosis sel donor (sel hidup, sel apoptosis dini, sel apoptosis lanjut) pada ada tidaknya pembelahan (*cleavage*), dan tingkat perkembangan (4-8 sel, morula, blastosis) dari sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Tujuan Penelitian

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah untuk memproduksi *stem cell* sebagai bahan *graft* untuk terapi penggantian sel, yang tidak direjeksi oleh tubuh, karena mempunyai gene yang sama (*stem cell* yang singeneik). Teknologi yang dipakai untuk mencapai hal tersebut adalah teknologi TNS. Namun saat ini TNS mempunyai efisiensi yang masih

rendah. Salah satu faktor penentu keberhasilan TNS adalah faktor sel donor. Tujuan penelitian adalah

Tujuan umum

- Mengetahui pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus pada derajat apoptosis sel donor.
- Mengetahui pengaruh derajat apoptosis sel donor nukleus pada perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Tujuan khusus

- Mengetahui pengaruh jumlah subpasase sel donor nukleus pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
- Mengetahui pengaruh hari (lamanya) starvasi serum sel donor nukleus pada persentase jumlah sel hidup, sel apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor.
- Mengetahui pengaruh derajat apoptosis sel donor (sel hidup, sel apoptosis dini, sel apoptosis lanjut) pada ada tidaknya pembelahan (*cleavage*), dan tingkat perkembangan (4-8 sel, morula, blastosis) dari sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Manfaat

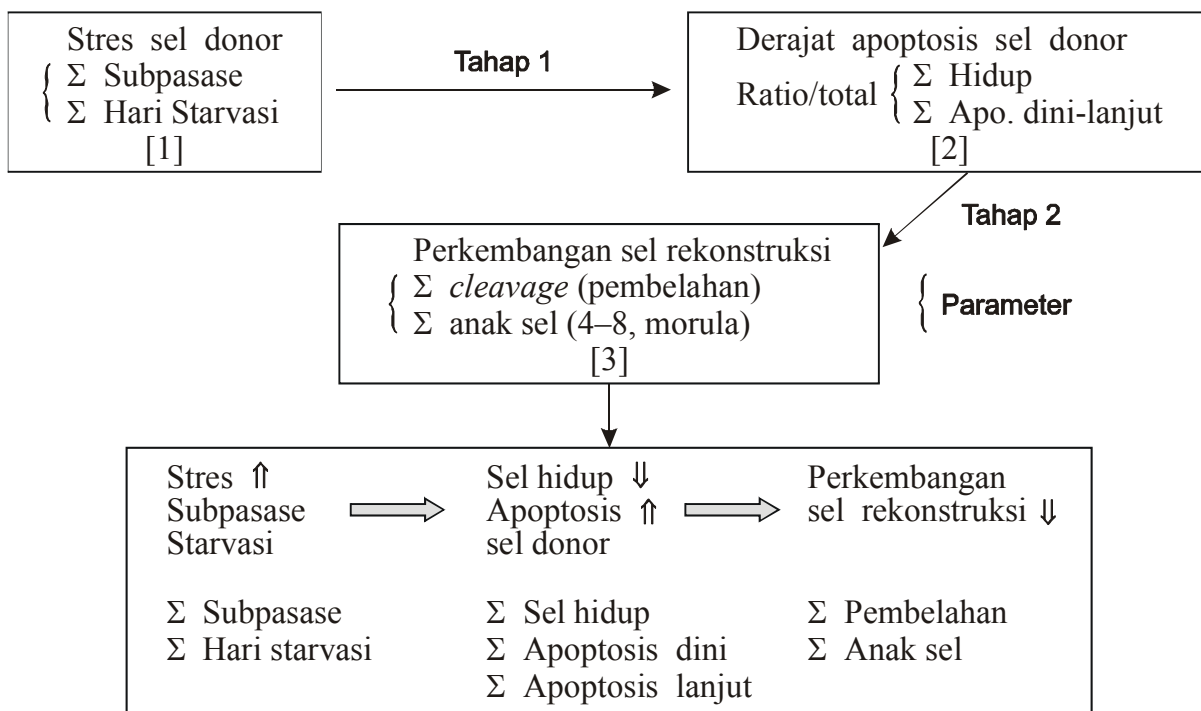
Manfaat dari penelitian ini adalah:

Manfaat praktis

- Hasil penelitian merupakan langkah awal untuk pengembangan teknik produksi *stem cell* yang singeneik untuk keperluan terapi penggantian sel.
- Langkah lanjutan dari penelitian ini untuk menuju tujuan jangka panjang antara lain kultur sel rekonstruksi hasil TNS untuk memproduksi blastosis, produksi *stem cell* dari blastosis (*inner cell mass*), uji aplikasi pada hewan coba dan uji klinis.
- Data penelitian dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk meningkatkan efisiensi teknik TN.

Manfaat teoritis

Data penelitian merupakan informasi dasar yang penting untuk menelaah derajat degenerasi DNA pada peristiwa apoptosis dalam proses *reprogramming* DNA nukleus sel dalam perkembangan sel rekonstruksi. Hal ini akan mendasari perkembangan teknologi pemakaian *stem cell* untuk kepentingan terapi di bidang kedokteran regeneratif.



Gambar 1. Kerangka konsep dan hipotesis penelitian.

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

Kerangka Konsep Penelitian

Konsep yang digunakan untuk membangun hipotesis penelitian ini terutama adalah konsep tentang (1) Stres sel donor; (2) Kualitas sel donor; (3) Keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi.

Secara skematis kerangka konsep dan hipotesis penelitian disajikan pada Gambar 1.

• Stres sel donor

Subpasase dan starvasi serum merupakan stres bagi sel. Selama terjadi proses pembelahan stres yang terjadi dalam kultur menimbulkan kerusakan berupa peningkatan konsentrasi protein yang abnormal pada intraseluler, meningkatnya mitokondria yang rusak, kerusakan akibat radikal bebas dan penuaan replikasi berupa pemendekan telomer.²⁰ Selain itu, sel donor yang dikultur juga ada pembatasan intrinsik yang tertentu kemampuan membelahnya dan batas kemampuan membelah ini berhubungan dengan proses penuaan.²² Penuaan sel sebagai konsekuensi dari pemendekan telomer dan telomer yang sangat pendek tidak dapat lagi mencegah kerusakan dan penyambungan kromosom *end-to-end*. Kondisi kerusakan dan penyambungan kromosom *end-to-end* ini menyebabkan apoptosis.²⁰ Demikian pula pada kultur starvasi serum, juga dapat menimbulkan aneuploidi yang selanjutnya menimbulkan apoptosis dan kerusakan dari sel.^{19,21}

Parameter stres sel donor dalam penelitian ini dinyatakan sebagai jumlah subpasase dan hari (lamanya) starvasi serum.

• Derajat apoptosis sel donor

Perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS menggambarkan kesempurnaan *reprogramming* nukleus sel rekonstruksi. Salah satu faktor yang mempengaruhi kesempurnaan *reprogramming* sel rekonstruksi hasil TNS adalah kualitas sel donor atau faktor sel donor. Faktor-faktor sel donor yang telah diketahui mempengaruhi kesempurnaan *reprogramming* sel rekonstruksi hasil TNS meliputi jenis sel donor, sumber sel donor dan fase siklus sel donor. Dari faktor jenis sel donor, fibroblas lebih efisien dibanding sel kumulus, sel *oviduct* maupun sel otot. Dari faktor sumber sel, sel yang lebih muda lebih efisien, sebagai contoh sel fetus lebih efisien dibanding sel dewasa. Dari faktor siklus sel, sel fase G0/G1 lebih efisien dibanding sel pada fase lainnya.^{10,19,20}

Preparasi sel donor untuk keperluan TNS, yaitu subpasase dan kultur starvasi serum, merupakan stres yang dapat menimbulkan perubahan karak-

teristik sel donor berupa kerusakan sel seperti tersebut pada poin pertama tersebut di atas dan menimbulkan berbagai derajat apoptosis. Belum jelas bagaimana pengaruh perubahan karakter sel donor (derajat apoptosis) akibat subpasase dan starvasi serum terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS. Parameter derajat apoptosis sel donor yang dipakai pada penelitian ini adalah rasio sel hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut terhadap jumlah keseluruhan sel.

• Perkembangan sel rekonstruksi

Pada TNS, nukleus dari sel rekonstruksi yang dihasilkan merupakan nukleus sel somatik yang telah terdiferensiasi. Agar sel rekonstruksi dapat tumbuh normal, maka nukleus sel somatik yang telah terdiferensiasi tersebut perlu terjadi *reprogramming* yaitu perubahan dari nukleus dari sel somatik yang telah terdiferensiasi menjadi sel totipoten kembali yang merupakan sel yang belum terdiferensiasi. Hal utama yang terjadi pada *reprogramming* nukleus donor adalah demetilasi pada basa sitosin DNA untuk memulihkan ekspresi gene dan pertukaran *Histone* (H1) untuk menghapus memori sel.¹¹ Ketidaktepatan (inefisiensi) dari *reprogramming* merupakan penyebab utama masih rendahnya efisiensi dari TNS.

Perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS menggambarkan *reprogramming* nukleusnya¹², tetapi *reprogramming* sel rekonstruksi juga bisa dinilai dari *marker* pluripotensi sel yaitu adanya ekspresi *oct-4* dan *GCAP* dari mRNA yang merupakan *marker* pluripotensi dari sel manusia dan mencit.¹¹ Parameter dari perkembangan sel rekonstruksi pada penelitian ini jumlah (tingkat) pembelahan dan jumlah anak sel (4-8 sel, formula) dari sel rekonstruksi.

Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian adalah:

- Subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus mempengaruhi derajat apoptosis sel donor.
- Derajat apoptosis sel donor nukleus mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Secara spesifik, hipotesis penelitian adalah:

- Hipotesis penelitian tahap 1
 - Peningkatan jumlah subpasase sel donor nukleus menurunkan persentase jumlah sel hidup, meningkatkan persentase sel apoptosis dini dan meningkatkan persentase sel apoptosis lanjut dari sel donor.
 - Peningkatan hari (lamanya) starvasi serum sel donor nukleus menurunkan persentase jumlah

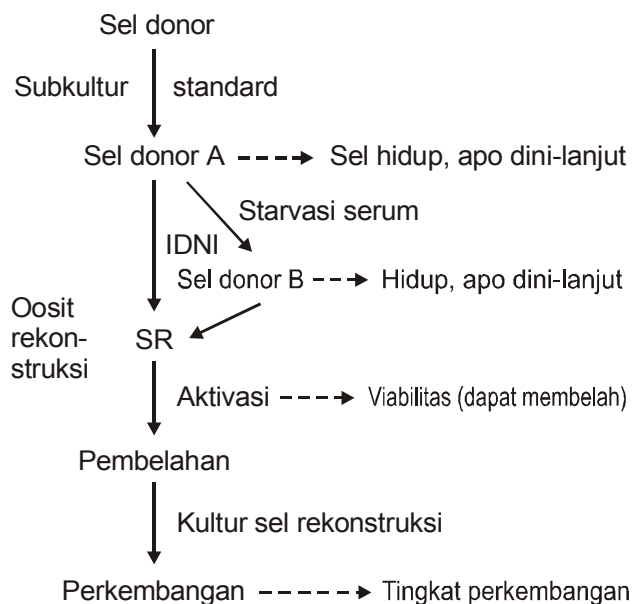
sel hidup, meningkatkan persentase sel apoptosis dini dan meningkatkan persentase sel apoptosis lanjut dari sel donor.

- Hipotesis penelitian tahap 2
Peningkatan derajat apoptosis sel donor (sel hidup, sel apoptosis dini, sel apoptosis lanjut) menurunkan tingkat pembelahan (*cleavage*), dan tingkat perkembangan (4-8 sel, morula, blastosis) dari sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Kerangka Operasional Penelitian

Kegiatan penelitian secara umum dibagi dalam 2 tahap yaitu tahap pendahuluan dan tahap eksperimental. Tahap pendahuluan optimalisasi teknik IDNI sebagai metode TNS, dinilai integritas sel rekonstruksi yang dihasilkan dan viabilitasnya. Tahap eksperimental ada dua tahap, pertama, kultur sel donor dengan medium standar untuk memproduksi sel donor (sel donor A). Kultur sel donor A dilanjutkan dengan medium starvasi serum untuk memproduksi sel donor (sel donor B) kemudian dilakukan pemeriksaan jumlah sel hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut sel donor A maupun sel donor B. Kedua, eksperimen pengaruh jumlah sel hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI.

Secara skematis kerangka operasional disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kerangka operasional penelitian

IDNI: Intracytoplasmic Direct Nuclear Injection; SR: Sel Rekonstruksi. Apo=apoptosis

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian adalah eksperimen laboratorium, yang kegiatannya dapat dibagi dalam dua tahap, yaitu tahap pendahuluan dan tahap eksperimental. Selanjutnya, tahap eksperimental dibagi lagi menjadi dua tahap yaitu tahap 1 dan tahap 2. Penelitian pendahuluan adalah penelitian TNS teknik IDNI. Tahap ini dimaksudkan untuk optimalisasi prosedur TNS yang akan digunakan. Penelitian tahap ke 1 adalah preparasi sel donor nukleus yang akan digunakan dalam TNS yaitu penelitian tentang pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor nukleus pada derajat apoptosis sel donor. Penelitian tahap 2 adalah penelitian tentang pengaruh derajat apoptosis sel donor nukleus pada perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dengan teknik IDNI. Tahap ini dimaksudkan sebagai upaya untuk meningkatkan efisiensi TNS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dan Pembahasan Penelitian Pendahuluan

Hasil

Hasil penelitian disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Tingkat enukleasi, degenerasi dan insersi nukleus dengan teknik Insersi langsung ke Intrasiitoplasma (IDNI).

| Parameter | Jml oosit/total | % keberhasilan |
|-------------------------------|-----------------|----------------|
| E nukleasi | | |
| Tanpa degenerasi | 430/591 | 72,76% |
| Degenerasi | 161/591 | 27,24% |
| Konfirmasi enukleasi berhasil | 183/355 | 51,55% |
| Insersi | | |
| Normal | 179/391 | 45,78% |
| Lisis | 59/391 | 15,09% |
| Lain-lain (rusak, hilang) | 153/391 | 39,13% |

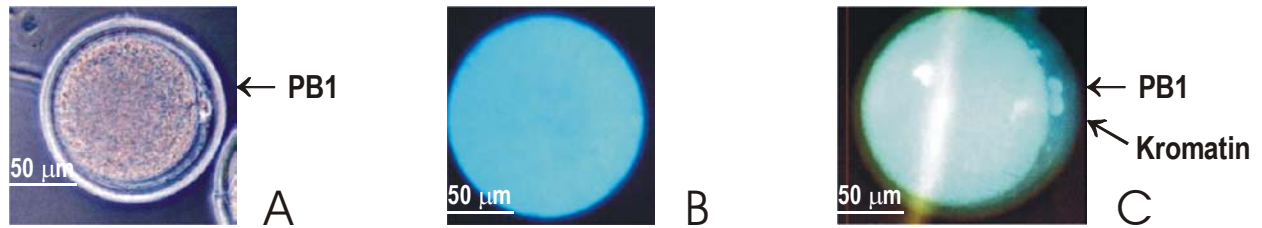
Tabel 2. Tingkat Pembelahan (*cleavage*) sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi.

| Sel Rekonstruksi | | | |
|--------------------|----------|---------------------|----------------------------------|
| Dilakukan Aktivasi | | Membelah (Cleavage) | |
| Kontrol Subpasase | Starvasi | Kontrol | Starvasi |
| 63 | 72 | 68 | 28(44,44%) 12(16,67%) 7 (10,29%) |

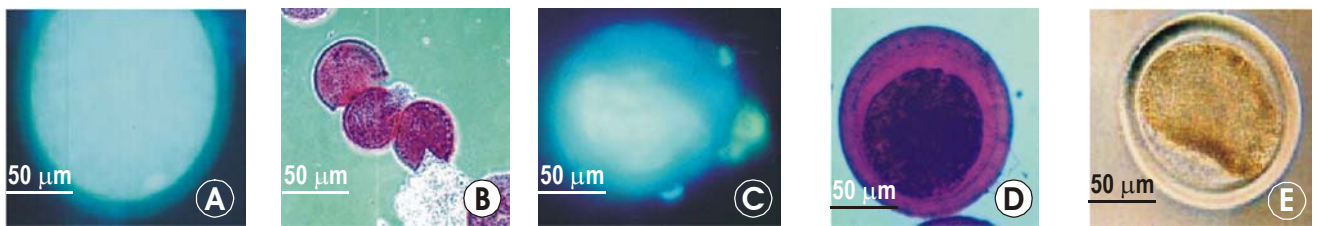
Keterangan:

Subpasase: Sel rekonstruksi hasil TNS menggunakan sel donor hasil subpasase.

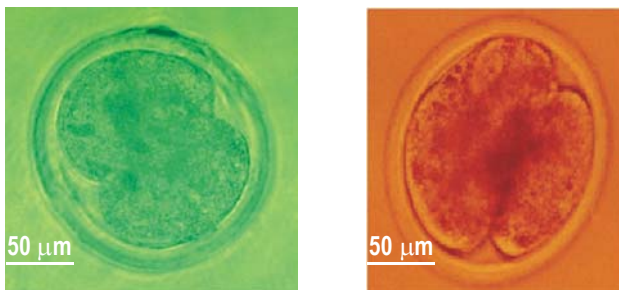
Starvasi: Sel rekonstruksi hasil TNS menggunakan sel donor hasil kultur starvasi serum.



Gambar 3. Visualisasi dan konfirmasi keberhasilan enukleasi dengan pewarnaan H-33342. A. Oosit dengan PB-I, cahaya biasa. B. Oosit hasil enukleasi setelah dikonfirmasi, tanpa PB-I dan tanpa kromatin, C. Oosit sebelum di enukleasi, masih menampilkan PB-I dan kromatin (nukleus) tanda panah.



Gambar 4. Sitoplasma resipien. A. Oosit hasil enukleasi yang masih utuh (nukleus gagal teraspirasi) B. Oosit hasil insersi yang mengalami lisis. C. Oosit setelah enukleasi dengan pewarnaan H 33342. D. Oosit enukleasi dengan pewarnaan Giemsa. E. Oosit enukleasi normal, cahaya biasa.



Gambar 5. Sel rekonstruksi yang membelah setelah dilakukan aktivasi.

Pembahasan

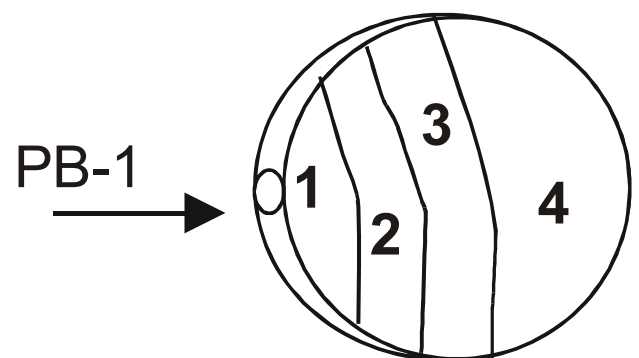
1. E nukleasi

E nukleasi oosit akan lebih mudah dilakukan dengan teknik otomatisasi, yaitu teknik manipulasi oosit (memegang, menggerakkan dan memutar) memakai tenaga listrik.¹³ Manipulasi oosit pada penelitian ini dilakukan secara manual. E nukleasi dilakukan menggunakan pipet standar, diinsersikan pada daerah sekitar polar bodi masuk ke dalam sitoplasma. Selanjutnya sitoplasma diaspirasi dapat dengan tenaga air (*hydraulic pressure*), oli (*oil pressure*) atau tekanan udara (*air pressure*). Pada penelitian ini menggunakan tenaga oli.

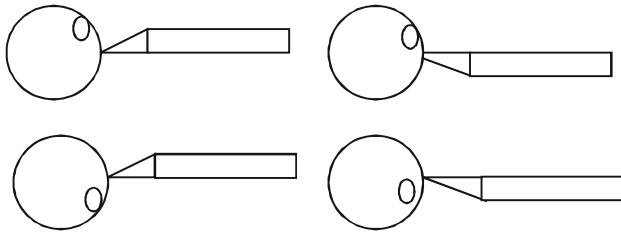
E nukleasi yang ideal pada oosit resipien, seharusnya dilakukan aspirasi sebanyak volume sitoplasma yang sama dengan volume sel donor yang akan diinsersikan, karena akan lebih sesuai bagi

perkembangan normal sel rekonstruksi.²³ Di sisi lain, target enukleasi adalah untuk dapat mengambil material kromatin dari sel resipien yang nantinya akan diganti oleh material kromatin sel donor.

Untuk memperoleh tingkat enukleasi yang baik, maka sangat diperlukan pengetahuan posisi material kromatin dari sel oosit resipien.²⁴ Posisi relatif kromatin terhadap PB-1 dibagi menjadi 4 katagori (Gambar 6). Oosit Matur (M-II) ditandai secara visual dengan adanya ekstruksi PB-1. Pada kondisi ini, maka letak kromatin adalah dekat dengan posisi ekstruksi PB-1 pada ruang perivitellin. Nour dan Takahashi melaporkan bahwa pada oosit sapi matur dengan posisi kromatin dalam posisi 1 dan 2 dapat dienukleasi dengan baik pada aspirasi sitoplasma sebanyak 20%.²⁵



Gambar 6. Skema posisi relatif kromatin terhadap PB-1. 1. Kromatin terletak dekat dengan PB-1; 2. 1/3 sitoplasma dekat PB-1; 3. Kromatin antara 1/2 dan 1/3 sitoplasma. 4. 1/4 sitoplasma jauh dari PB-1.



Gambar 7. Kemiringan jarum. (A) Kemiringan benar. Material kromatin di hemisfer atas. Yang diaspirasi hemisfer atas. (B) Kemiringan salah. Material kromatin di hemisfer atas. Yang diaspirasi hemisfer bawah. (C) Kemiringan salah. Material kromatin di hemisfer bawah. Yang diaspirasi hemisfer atas. (D) Kemiringan benar. Material kromatin di hemisfer bawah. Yang diaspirasi hemisfer bawah.

Hal lain yang perlu diperhatikan untuk meningkatkan tingkat keberhasilan enukleasi adalah dengan memperhatikan arah ketajaman pipet terhadap polar bodi. Material kromatin berada di dekat polar bodi sehingga kemiringan/ketajaman pipet perlu diarahkan ke polar bodi seperti pada Gambar 7.

2. Inseri Nukleus langsung ke Intrasisitoplasma

Inseri nukleus biasanya dilakukan dengan menginsersikan ke dalam ruang perivitelin. Selanjutnya dilakukan fusi sel dengan rangsangan elektrik. Idealnya inseri sel dilakukan dengan teknik otomatisasi yaitu dengan mekanisme *micro movement (Piezoelectric Impact Drive Mechanism)*.^{13,15} Pada penelitian ini, inseri dilakukan secara manual langsung ke intrasisitoplasma, sehingga tidak memerlukan fusi sel. Sel donor yang digunakan, sebelumnya telah dilakukan subpasase sebanyak 3 kali. Dari keseluruhan oosit 591 buah yang dilakukan enukleasi, maka sekitar 430 (72,76%) oosit hasil enukleasi yang kemudian diinsersi dengan sel donor, ada 179 (45,78%) bila dilakukan dengan baik menghasilkan sel rekonstruksi yang normal.

Ada beberapa permasalahan teknis yang dihadapi dengan teknik IDNI yang nantinya berpengaruh terhadap tingkat keberhasilan inseri dan pertumbuhan sel rekonstruksi, yaitu (1) Lisis, karena kerusakan Zp (zona pelusida) oosit atau membran sitoplasma oosit karena kurang sempurnanya lubang (*slit*) yang dibuat oleh tusukan pipet injeksi/enukleasi sebelumnya. (2) Kontaminasi medium yang masuk bersama nukleus donor ke intrasisitoplasma sehingga mengambil ruang di sitoplasma dan (3) Masuknya nukleus donor lebih dari satu. Permasalahan tersebut diduga akan berpengaruh terhadap potensi sel rekonstruksi untuk bisa tumbuh lebih lanjut. Kemungkinan adanya sel donor terinsersi lebih dari satu akan menimbulkan peluang munculnya ploidi yang tidak normal dan hal tersebut akan berpe-

ngaruh terhadap perkembangan sel rekonstruksi berikutnya.

Seleksi terhadap sel donor sebelumnya telah dilakukan berdasar sel hidup dan ukuran sel. Pada subpasase 3 sel hidup mencapai 79,55%. (Tabel 3) Sedangkan sel donor yang digunakan adalah yang berukuran kecil yaitu kurang dari 6 μm dengan asumsi bahwa sel tersebut dalam fase G0/G1.²⁶

3. Pembelahan sel

Pada TNS, oosit enukleasi yang berhasil dilakukan inseri nukleus pada ruang perivitelin (sel rekonstruksi), dilanjutkan dengan fusi sel memakai aliran listrik. Fungsi aliran listrik ini, selain untuk merangsang fusi sel, sekaligus berfungsi untuk aktivasi. Pada TNS dengan teknik IDNI, setelah inseri nukleus ke dalam sitoplasma, perlu dilakukan inisiasi pembelahan sel dengan aktivasi. Pada penelitian ini setelah dilakukan aktivasi (dengan Etanol 10% dan DMAP), sel rekonstruksi dengan nukleus donor sel starvasi maupun *growing cell*, keduanya dapat membelah. Dari 72 sel rekonstruksi dengan nukleus donornya *growing cell*, ada 12 sel yang membelah (16,67%). Sedangkan sel rekonstruksi dengan nukleus donornya sel starvasi, dari 68 ada 7 sel yang membelah (10,29%). Total dari 140 sel rekonstruksi (nukleus donor sel starvasi dan *growing cell*) ada 19 sel yang membelah (13,57%).

Oosit yang digunakan dalam TNS ini menggunakan oosit matur (M-II). Pentingnya pemakaian oosit matur untuk TNS ini ada dua hal. Pertama, oosit matur tidak konstan mensintesa CSF, yang berfungsi mempertahankan MPF kadar tinggi. Pada oosit immatur masih mensintesa CSF secara konstan. Dengan demikian, setelah dilakukan aktivasi, timbul osilasi Ca^{2+} yang akan merusak CSF, selanjutnya degradasi siklin B dari MPF dan menurunnya MPF akan merangsang mitosis.¹⁵ Kedua, pada oosit immatur, *germinal vesicle* (GV) penuh dengan *proteasome*. Selama maturasi oosit, GV pecah dan *proteasome* dilepaskan dalam ooplasma dan tersedia untuk infiltrasi sel donor setelah dilakukan TNS. Dengan demikian, sangatlah jelas bahwa bila TNS menggunakan oosit immatur (yang masih mensintesa CSF) dan ikut terbuangnya GV selama aspirasi nukleus dalam enukleasi, secara bermakna akan menurunkan kemungkinan *reprogramming* dan perkembangan sel rekonstruksi setelah TNS.^{15,27}

Dengan dipakainya oosit yang matur dan dalam aspirasi nukleus selama enukleasi ooplasma yang disedot keluar sekitar 10-25% dan tidak boleh melebihi 50%, maka *proteasome* yang tersisa jumlahnya masih cukup untuk infiltrasi ke nukleus donor sebagai syarat agar sel rekonstruksi dapat membelah. Dengan adanya hasil sel rekonstruksi yang

dapat membelah, berarti pemakaian teknik IDNI dalam TNS ini masih menyisakan cukup *proteasome* dalam ooplasma.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

- TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang mempunyai integritas normal (tidak lisis, tidak degenerasi, sitoplasma terambil 10-25%)
- TNS teknik IDNI dapat menghasilkan sel rekonstruksi yang dapat *cleavage*.
- Teknik IDNI dapat digunakan untuk produksi sel rekonstruksi, namun perlu keterampilan mikro-manipulasi yang baik.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, untuk membandingkan tingkat keberhasilan produksi sel rekonstruksi dengan teknik IDNI secara manual dibanding dengan teknik otomatisasi.

Hasil dan Pembahasan Penelitian tahap 1

Hasil

Pada kultur standar sampai subpasase 3 mempunyai persentase jumlah sel hidup paling baik. Sedangkan pada kultur starvasi serum, sampai hari 3 persentase jumlah sel hidup masih relatif baik, selbihnya menurun secara drastis.

Tabel 3. Kultur fibroblas dan jumlah sel hidup hasil kultur standar.

| Kultur | Sel hidup (%) | Sampel (n) | Ket |
|--------------------------|---------------|------------|------|
| Fibroblas fetus | | | |
| Primer | 89,95 ± 4,16 | 20 | |
| Subpasase 1 | 84,65 ± 5,08 | 20 | |
| Subpasase 2 | 76,15 ± 1,72 | 20 | |
| Subpasase 3 | 79,55 ± 3,93 | 20 | SV |
| Subpasase 4 | 78,3 ± 5,43 | 20 | |
| Subpasase 5 | 75,55 ± 5,64 | 20 | |
| Fibroblas telinga dewasa | | | |
| Primer | 83,25 ± 3,17 | 12 | |
| Subpasase 1 | 80 | 1 | Stop |

Keterangan: SV: Dilakukan starvasi serum.
Stop: Selanjutnya kultur dihentikan.

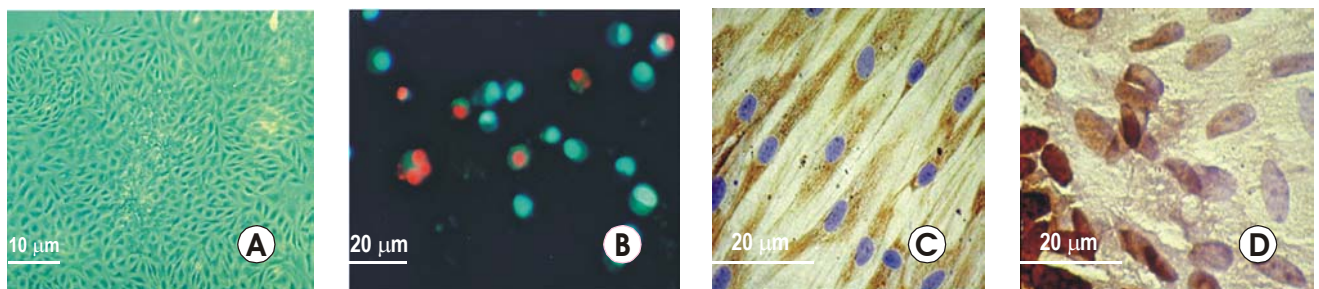
Tabel 4. Sel hidup dari kultur standar subpasase 3 yang dilakukan starvasi serum.

| Hari ke | Sel hidup (%) | Sampel (n) | Keterangan |
|---------|---------------|------------|------------|
| 1 | 65,55 ± 4,19 | 20 | |
| 2 | 60,65 ± 5,83 | 20 | |
| 3 | 56,1 ± 5,94 | 20 | |
| 5 | 29,1 ± 8,96 | 20 | |
| 6 | 4,45 ± 3,56 | 20 | |

Tabel 5. Apoptosis dini dan Apoptosis lanjut dari kultur sel donor.

| Kultur | Apoptosis lanjut (%) | Apoptosis dini (%) |
|----------------|----------------------|--------------------|
| Subpasase | 11,67 ± 2,08 | 24,00 ± 6,08 |
| Starvasi serum | 42,33 ± 7,57 | 41,67 ± 2,08 |

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ada bukti kuat terdapat asosiasi antara sistem kultur (subpasase dan starvasi serum) dengan ketiga karakter sel donor (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut). (Tabel 4 dan 5)



Gambar 8. Fibroblas. (A) Kultur fibroblas konfluen. (B) Pemeriksaan sel hidup dengan pengecatan H 33342-Propidium Iodide. Sel mati (merah) dan sel hidup (hijau). (C) Pemeriksaan apoptosis. Apoptosis dini sitoplasma tercat coklat. (D) Pemeriksaan apoptosis lanjut. Apoptosis lanjut nukleus tercat coklat.

Tabel 6. Hasil analisis statistik asosiasi antara subpasase konfluen dan starvasi serum dengan karakter sel donor.

| Sistem Kultur | Karakteristik Sel | | |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Apo. Dini (%) | Apo. Lanjut (%) | Sel Hidup (%) |
| Subpasase | 24,00 ^a | 11,67 ^a | 79,55 ^b |
| Starvasi serum | 41,67 ^b | 42,3 ^b | 56,1 ^a |

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama berarti ada bukti kuat terdapat asosiasi antara sistem kultur dengan karakter sel ($P < 0,001$). Apo = apoptosis.

Pembahasan

Penyediaan sel donor dalam TNS dengan dilakukan subpasase dan starvasi serum telah dilakukan banyak peneliti. Namun belum ada standar, berapa kali subpasase sebaiknya dilakukan dan berapa hari starvasi serum dilakukan. Melakukan subpasase 3-5 kali²⁵ dan 2-10 kali.²⁸⁻³¹ Preparasi dilanjutkan dengan menginduksi menjadi sel *quiscent* dengan cara starvasi serum. Lama starvasi serum juga belum ada standar baku berapa hari perlu dilakukan. Beberapa peneliti melakukan starvasi serum dalam jangka waktu yang berbeda-beda pula. Melakukan starvasi serum selama 4-8 hari, 2-3 hari, 2-6 hari dan 9-13 hari.²⁸⁻³¹ Hasil perkembangan juga bervariasi. Dari 180 sel rekonstruksi yang dilakukan aktivasi, ada 6 (3,3%) terjadi pembelahan, 1 (0,55%) mencapai stadium 4 sel, 2 (1,1%) mencapai stadium morula dan 1 (0,55%) mencapai blastosis. Dari 141 sel rekonstruksi, yang menggunakan sel donor fibroblas kultur standar menghasilkan 122 terjadi pembelahan dan 39 mencapai stadium blastosis. Menggunakan sel donor fibroblas starvasi serum, dari 197 sel rekonstruksi, 184 terjadi pembelahan sel dan 80 mencapai stadium blastosis.²⁹ Dari 54 sel rekonstruksi yang dikultur, terjadi 25 (46,3%) pembelahan, 22 mencapai morula dan 2 mencapai blastosis.³¹

Selain untuk ketersediaan sel donor dan induksi menjadi *quiscent*, beberapa peneliti tersebut di atas tidak menuliskan alasan mengapa subpasase dilakukan dalam jumlah tertentu dan starvasi serum juga dilakukan dalam hari (lamanya) tertentu. Penelitian ini ingin mengetahui pengaruh jumlah subpasase dan lama starvasi serum terhadap derajat apoptosis sel donor dan dimaksudkan nantinya untuk dipelajari kaitannya dengan keberhasilan perkembangan sel rekonstruksi.

Subpasase berlebihan menimbulkan efek samping kerusakan sel dan apoptosis²⁰ dan kerusakan sel akibat efek samping dari subpasase dapat meningkatkan kegagalan TNS.¹⁹ Dengan demikian, preparasi sel donor untuk keperluan TNS ini dilakukan kultur beberapa kali (subpasase) untuk mendapatkan sel yang "baik" dan dalam jumlah sel

yang cukup, namun dalam jumlah subpasase yang tidak berlebihan sebelum banyak menimbulkan efek samping merugikan pada sel. Penilaian sel donor yang "baik" ini dilihat dari persentase jumlah sel hidup dan apoptosis sel. Hasilnya, sampai subpasase 3 masih mempunyai persentase jumlah sel hidup yang masih relatif baik. Selanjutnya subpasase 3 ini dilakukan pemeriksaan apoptosis dini dan apoptosis lanjut, hasilnya ada 11,67% apoptosis lanjut dan 24% apoptosis dini.

Starvasi serum dilakukan untuk menginduksi sel donor masuk siklus sel fase G0/G1. Meskipun sel donor di luar fase siklus sel G0/G1 ada yang dapat menghasilkan keturunan¹⁸ sebagai contoh seperti pada sapi, sel donor di luar fase G0/G1 (*growing cell*) dapat menghasilkan keturunan^{19,32} namun sel donor fase G0/G1 meningkatkan angka keberhasilan TNS.¹⁶⁻¹⁹ Di lain pihak, starvasi serum ternyata banyak menimbulkan efek samping kerusakan sel dan kerusakan sel akibat efek samping starvasi serum meningkatkan kegagalan TNS.^{19,21} Sampai hari 3 starvasi serum persentase jumlah sel hidup masih relatif baik (56,1%), selanjutnya meningkat dengan cepat. Pada hari 3 starvasi serum, didapatkan apoptosis lanjut sebanyak 42,33% dan apoptosis dini sebanyak 41,67%.

Hasil analisis statistik (Tabel 6) menunjukkan ada asosiasi bahwa semakin banyak subpasase, akan semakin meningkatkan persentase jumlah sel yang mengalami kematian, apoptosis dini maupun apoptosis lanjut. Demikian pula starvasi serum, mempunyai efek yang sama yaitu semakin banyak lama starvasi serum, akan semakin meningkatkan persentase jumlah sel yang mengalami kematian, apoptosis dini maupun apoptosis lanjut.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Tekanan kondisional selama kultur (subpasase dan starvasi serum) mempengaruhi viabilitas dan apoptosis sel donor. Pada proses kultur terjadi peningkatan ratio apoptosis seiring dengan bertambah lamanya kultur dan berkurangnya kadar serum. Hal ini mengindikasikan bahwa keterbatasan serum dalam kultur merupakan stimulator terjadinya apoptosis, namun masih perlu dilihat lebih jauh mekanisme, bagaimana hal ini terjadi.

Saran

Berdasarkan kesimpulan yang dihasilkan, disarankan hal-hal berikut:

- Sumber nukleus donor dari kultur standar untuk TNS adalah subpasase 2 atau subpasase 3.
- Sumber nukleus donor dari kultur starvasi serum untuk TNS adalah starvasi serum hari 3.

Hasil dan Pembahasan Penelitian tahap 2

Hasil

Hasil aktivasi sel rekonstruksi menggunakan sel donor A, yaitu sel donor fibroblas fetus subpasase 3 dan fibroblas fetus starvasi serum disajikan pada Tabel 7 di bawah ini. Induksi aktivasi pada penelitian ini digunakan etanol 7% dikombinasikan dengan 6-DMAP, sementara sebagai kontrol digunakan sel parthenogenesis hasil aktivasi oosit M-II.

Tabel 7. Aktivasi, pembelahan sel (*cleavage*) dan pertumbuhan sel rekonstruksi.

| Kontrol Parthenogenesis | | | | |
|-------------------------|-----|-------|--------|-----------|
| Oosit | 2 | 4 – 8 | Morula | Blastosis |
| 547 | 222 | 104 | 51 | 0 |

| Perlakuan | | | | | | | | | |
|-------------|---------|--------|--------|---|-------------|---------|---------|---|---|
| Sel Donor A | | | | | Sel Donor B | | | | |
| R | 2 | 4-8 | M | B | R | 2 | 4-8 | M | B |
| 125 | 19 | 3 | 3 | 0 | 118 | 15 | 7 | 0 | 0 |
| | (15,2%) | (0,8%) | (0,8%) | | | (12,7%) | (5,93%) | | |

Keterangan:

2: Stadium pertumbuhan 2 sel;

4-8: Stadium pertumbuhan 4-8 sel;

M: Stadium pertumbuhan mencapai Morula;

B: Stadium pertumbuhan mencapai Blastosis;

R: Sel Rekonstruksi

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tingkat pembelahan sel rekonstruksi masih cukup rendah yaitu 12,7% pada sel starvasi dan 15,2% pada sel donor konfluen (subpasase). Pada sel donor konfluen dihasilkan sel hingga fase morula sementara pada sel starvasi serum hanya mampu berkembang hingga 4-8 sel. (Gambar 9)

Hasil analisis statistik pada pengaruh karakteristik sel donor (sel hidup, apoptosis dini dan apopto-

sis lanjut) terhadap pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi dengan menggunakan fibroblas hasil subpasase konfluen dan starvasi serum menunjukkan adanya asosiasi yang kuat. Namun demikian, kultur terhadap sel rekonstruksi dalam medium dasar TCM199, belum mampu menghasilkan sel yang mencapai blastosis. Pada kelompok sel donor dengan sistem kultur starvasi serum bahkan pertumbuhannya hanya mencapai tahap 4-8 sel. (Tabel 8)

Tabel 8. Hasil analisis statistik asosiasi antara sistem kultur terhadap pembelahan dan perkembangan sel rekonstruksi

| Sistem kultur | Pertumbuhan Sel Rekonstruksi | | | |
|----------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | 2 sel | 4-8 sel | M | B |
| Subpasase | 19 ^b | 3 ^a | 3 ^b | 0 ^a |
| Starvasi serum | 15 ^a | 7 ^b | 0 ^a | 0 ^a |

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama berarti terdapat asosiasi yang kuat ($P < 0,001$).

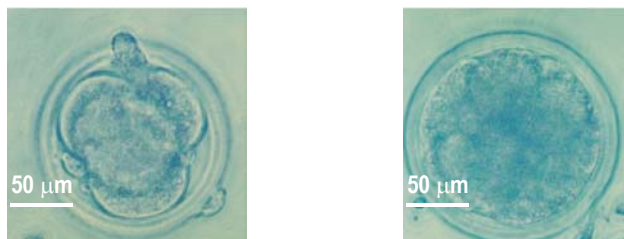
Pembahasan

Tingkat keberhasilan TN yang relatif masih sangat rendah seperti dilaporkan dari banyak penelitian sangat ditentukan oleh beberapa faktor di antaranya adalah maturasi oosit, kesesuaian fase nukleus donor dan sitoplasma resipien atau sinkronisasi siklus sel.³³ Sementara suatu *reprogramming* sel yang tidak sempurna akan bisa menyebabkan kematian sel rekonstruksi dan tidak berkembangnya sel rekonstruksi.

Reprogramming sel merupakan mekanisme kompleks yang terjadi setelah dilakukan TN. Definisi *reprogramming* adalah dominasi molekuler dari satu tipe sel tertentu terhadap sel lainnya, sehingga terjadi transformasi nukleus berubah menjadi tipe yang dominan. Dalam konteks TN, definisi ini sangat sesuai. Inseri nukleus sel somatik ke suatu oosit (tipe dominan) dapat menghasilkan kelahiran hidup. Hal tersebut menunjukkan peran yang menentukan dari sitoplasma oosit dan pentingnya transformasi nukleus menjadi sel totipoten agar dapat tumbuh.¹⁴

Fibroblas fetus dipilih sebagai sumber sel donor dalam penelitian ini karena sel ini mempunyai potensi yang tinggi dalam kultur dan proses yang lebih lama jika diperlukan.³³ Pada penelitian ini dicobakan sel donor hasil starvasi serum agar diperoleh sel donor G0/G1, karena diharapkan bahwa sel donor pada fase ini lebih mudah menyesuaikan untuk terjadinya suatu *reprogramming* dibandingkan dengan sel fase yang lain.^{16,24}

Berbeda dengan kloning yang bertujuan memproduksi kopi organisme yang secara genetik ham-



Gambar 9. Pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi.

pir sama, TNS bertujuan memproduksi *stem cell* untuk keperluan kedokteran regeneratif.¹⁴ TN diartikan sebagai insersi nukleus asing ke oosit matur yang telah dienukleasi. *Reprogramming* merupakan mekanisme yang kompleks yang terjadi setelah TN.

Perkembangan dan diferensiasi dari sel rekonstruksi hasil TN terdiri dari beberapa tahap, (1) Pembelahan pertama dan aktivasi *genome* (*First cleavages and embryonic genome activation*) (2) Pembentukan blastosis (3) Gastrulasi (4) Pembentukan plasenta (5) Pertumbuhan post-natal. Modifikasi epigenetik, dimulai pada stadium pertama (Pembelahan pertama dan aktivasi *genome*). Dengan demikian, salah satu tantangan dalam tahap awal perkembangan sel rekonstruksi hasil TN adalah menekan pola ekspresi somatik dan mengaktifkan ekspresi embrionik secara benar. Perubahan epigenetik berupa *reprogramming* dari sel rekonstruksi berarti ada perubahan epigenetik menuju pada pemulihan ke arah keadaan totipotensi.¹⁴

Indikator untuk menilai keberhasilan *reprogramming* dapat dinilai dari *marker* pluripotensi sel yaitu adanya ekspresi faktor transkripsi Oct-4 dan GCAP atau dari pertumbuhannya.^{11,35} Pada penelitian ini dinilai tingkat pertumbuhannya. Tingkat pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TN menggambarkan *reprogramming*.^{11,35} Sel donor A dan sel donor B pada penelitian ini yang dikultur dengan kadar serum berbeda memberikan hasil pertumbuhan yang berbeda. Sel donor yang dilakukan starvasi serum hanya mampu sampai stadium 4-8 sel, sedangkan sel donor yang tidak dilakukan starvasi serum mampu mencapai stadium yang lebih tinggi. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa kadar serum medium kultur sel donor mempengaruhi *reprogramming* yang dilihat dari adanya pembelahan sel. Untuk pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TN, kadar serum standar lebih baik dibanding serum starvasi. Sel donor A yang hidup 79,55% dan sel donor B 56,1%. Disimpulkan bahwa sel donor nukleus untuk TN yang mempunyai persentase sel hidup banyak menghasilkan sel rekonstruksi yang mempunyai tingkat pembelahan dan pertumbuhan yang lebih baik.

Ditinjau dari aspek molekuler, pada *reprogramming* terjadi interaksi antara nukleus (*histone* dan DNA) dengan sitoplasma.^{11,12} Setelah TN dan juga pada ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) pada mencit, *Histone* H1 sel somatik dalam waktu 60 detik digantikan oleh *Histone* H1 dari oosit. Setelah stadium 2 atau 4 sel pertukaran *histone* terbalik kembali. *Histone* H1 dari oosit diganti kembali dengan *histone* H1 embrio. Hal ini merupakan konsekuensi dari dimulainya transkripsi dan translasi

dari gene yang menjadi H1 embrio dan terbatasnya waktu paruh (*half life*) dari *histone* H1 oosit. Hal ini menunjukkan bahwa *reprogramming* sel donor nukleus pada TN sama dengan *reprogramming* pada nukleus sperma setelah fertilisasi secara alamiah.¹¹ Hubungan dari *histone* dengan *reprogramming* adalah bahwa modifikasi *histone* dan protein kromatin lainnya seperti homolog grup Polycomb (Pcg) berkaitan dengan sistem memori sel dan berperan sebagai *repressor* transkripsi.¹² Aktivitas *reprogramming* pada DNA meliputi demetilasi.¹² Hilangnya metilasi DNA spesifik yang terjadi tanpa disertai replikasi DNA disebut demetilasi aktif. Mekanisme demetilasi aktif yang terjadi pada penelitian *in vitro* meliputi (1) Hilangnya grup 5-metil dari sitosin (2) Hilangnya basa sitosin-metil itu sendiri (dengan cara glikosilasi) (3) Hilangnya sejumlah nukleotida (*nucleotide excision repair*). Proses ini pada fertilisasi alamiah jelas terjadi pada *genome* paternal sedangkan pada sel-sel germinativum primordial belum jelas.¹²

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Keberhasilan TNS sangat dipengaruhi kondisi sel donor nukleus. Pada proses kultur (sel donor nukleus), terjadi proses apoptosis yang menyebabkan penurunan kualitas nukleus. Tingkat atau derajat apoptosis mempengaruhi kualitas nukleus donor, dengan demikian apoptosis lanjut pada sel donor nukleus sangat tidak menguntungkan untuk dipakai sebagai sel donor nukleus.

Berbagai macam tekanan kondisional selama kultur (subpasase dan starvasi serum) ternyata tidak menghilangkan kemampuan nukleus dari sel donor untuk TNS. Ini terbukti dari kemampuan sel rekonstruksi hasil TNS menggunakan sel donor nukleus subpasase dan starvasi serum yang masih dapat *cleavage* dan bahkan dapat mencapai perkembangan sampai stadium morula.

Saran

Berdasarkan penelitian ini maka disarankan perlunya dilakukan analisis lebih lanjut pada tingkat seluler dan molekuler sel donor yaitu

- Pengaruh derajat apoptosis pada proses *reprogramming* dengan menilai proses secara molekuler yaitu kesempurnaan hasil *reprogramming* nukleus sel rekonstruksi dengan melihat *marker* totipotensi (ekspresi oct-4 dan GCAP).
- Kerusakan kromosom dan sitoplasma sel donor karena pengaruh sistem kultur, dan pengaruh

nya pada keberhasilan *reprogramming* sel rekonstruksi secara molekuler.

HASIL DAN PEMBAHASAN UMUM

Hasil Umum

Hasil pengamatan terhadap karakteristik sel donor pada kedua jenis sistem kultur dan pembelahan atau pertumbuhan sel rekonstruksi yang dihasilkan disajikan pada Tabel 9.

Hasil analisis statistik menggunakan tabel kontigensi (*likelihood*) terhadap (1) Pengaruh sistem kultur (subpasase dan starvasi serum) sel donor dengan ketiga karakter sel donor (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut.) (2) Pengaruh sistem kultur (subpasase dan starvasi serum) sel donor dengan pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TNS dan (3) Pengaruh ketiga karakter sel donor (sel hidup, apoptosis dini, apoptosis lanjut) dengan pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TNS, dengan menggunakan fibroblas hasil subpasase konfluen dan starvasi serum menunjukkan adanya asosiasi yang kuat ($p < 0,01$).

Tabel 9. Sistem kultur, karakteristik sel donor, pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil IDNI.

| Sel Donor | | | |
|------------------------------|---------------|-------------------|------|
| Sistem kultur | Karakteristik | Jumlah sel/total | IDNI |
| Subpasase (sel donor A) | Apopt. dini | 72/300 (24%) | 125 |
| | Apopt. lanjut | 35/300 (11,67%) | |
| | Sel hidup | 1591/2000 (79,5%) | |
| Starvasi serum (sel donor B) | Apopt. dini | 125/300 (41,67%) | 118 |
| | Apopt. lanjut | 127/300 (42,3%) | |
| | Sel hidup | 1122/2000 (56,1%) | |

| Pertumbuhan Sel Rekonstruksi | | | |
|------------------------------|---------|---|---|
| 2 sel | 4-8 sel | M | B |
| 19 | 3 | 3 | 0 |
| 15 | 7 | 0 | 0 |

Pembahasan Umum

Penelitian eksperimental laboratoris pengaruh subpasase dan starvasi serum pada karakteristik sel donor

Penelitian eksperimental laboratoris pengaruh subpasase dan starvasi serum sel donor pada karakteristik sel donor menggunakan fibroblas fetus dan fibroblas kulit telinga kambing lokal dewasa. Digunakan fibroblas karena faktor efektivitas seperti telah dijelaskan dalam bab pendahuluan. Digunakan kambing karena (1) Faktor fisibilitas; (2) Subpasase

atau starvasi serum berpengaruh pada karakteristik sel donor, selain melalui faktor perubahan genetik juga melalui perubahan karena proses penuaan atau pemendekan telomer^{20,36} dan *sequence* telomer kambing mirip dengan manusia. Diharapkan perubahan karakteristik sel donor akibat pengaruh atau pemendekan telomer mempunyai efek yang sama dengan fibroblas manusia. Telomer merupakan ulangan *sequence* DNA dan protein pembentuk strukturnya yang terletak di ujung kromosom dari organisme eukariotik. *Sequence* DNA telomer adalah DNA noncodon, yang berisi ulangan 5'-TTAGGG-3'³⁶. *Sequence* ini sangat konservatif dan sama pada semua vertebrata.³⁶ Meskipun *sequence* telomer sangat konservatif pada vertebrata, namun masing-masing spesies mempunyai variasi spesifik dalam hal besarnya. Pada manusia sebesar 5-20 kilobase (kb); biri-biri 5-50 kb dan mencit 20-150 kb.²⁰ Telomer berfungsi memelihara kromosom dengan cara melindungi termini kromosom dari degradasi, fusi rekombinasi berlebihan yang terjadi selama mitosis. Kecuali pada sel-sel germinativum dan hampir semua sel kanker, telomer sel somatik akan memendek setiap kali pembelahan atau replikasi DNA sampai mencapai titik kritis yang tidak dapat melindungi lagi termini DNA. Pemendekan telomer *in vitro* maupun *in vivo* berhubungan dengan umur sel.^{38,39} Diperkirakan pemendekan telomer menyebabkan penuaan sel *in vitro* dan jika setelah terjadi pembelahan sel terjadi pemendekan telomer yang mencapai titik kritis, sel akan berhenti membelah. Panjang telomer yang sangat pendek (mencapai titik kritis) menyebabkan sel tidak dapat lagi mencegah kerusakan dan fusi antar kromosom yang akhirnya menimbulkan apoptosis.³⁰

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin banyak subpasase ratio sel hidup cenderung menurun. Ratio sel hidup pada kultur primer $89,95 \pm 4,16$; subpasase 1 sebesar $84,65 \pm 5,08$ subpasase 2 sebesar $76,15 \pm 1,72$ subpasase 3 sebesar $79,55 \pm 3,93$; subpasase 4 sebesar $78,3 \pm 5,43$ dan subpasase 5 sebesar $75,55 \pm 5,64$. Namun secara statistik penurunan ratio sel hidup tidak bermakna meskipun panjang dan jumlah telomer DNA pada kultur sel menurun sesuai serial pasase *in vitro*.³⁸ Tidak bermaknanya hubungan sel hidup dengan jumlah subpasase ini diduga karena sampai dengan subpasase 5 belum cukup banyak fibroblas yang panjang telomernya memendek sampai mencapai titik kritis yang dapat menyebabkan sel berhenti membelah dan menimbulkan apoptosis. Diperlukan subpasase yang lebih banyak untuk membuktikan adanya hubungan jumlah sel hidup dengan jumlah subpasase.

Kontaminasi merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur. Pada awalnya, fibroblas yang dipakai dalam penelitian ini adalah fibroblas fetus dan kulit telinga dewasa. Prosedur yang dipakai selama ini, untuk menghindari kontaminasi, selain dengan penyinaran UV pada *laminar air flow*, dipakai *spray* alkohol 70%. Hasilnya dari beberapa kali kultur primer fibroblas dewasa, semua terjadi kontaminasi kuman. Kultur primer fibroblas fetus dapat menghasilkan kultur bebas kuman, namun masih ada beberapa yang mengalami kontaminasi.

Pemakaian fibroblas fetus sebagai donor nukleus mempunyai efisiensi waktu yang lebih baik dibanding fibroblas kulit dewasa. Pada penelitian ini, keadaan kultur konfluen, bisa dipakai rata-rata dalam minggu ke 2 pada fibroblas fetus, sedangkan kulit dewasa rata-rata pada minggu ke 4. Hal ini konsisten dengan teori yang ada bahwa sifat sel yang mengalami penuaan yang paling umum dan paling konsisten, dengan hanya sedikit pengecualian, adalah penurunan tingkat proliferasi sel.²² Juga apabila dipakai sebagai sumber nukleus donor, berbeda apakah berasal dari sel embrio, fetus, muda atau dewasa. Sel yang lebih tua, lebih kurang potensinya sebagai sumber nukleus donor.¹⁰

Sel donor subpasase 3 pada penelitian ini dilakukan induksi agar menjadi keadaan *quiescence*. Cara induksinya adalah dengan melakukan *serum-deprivation* atau *serum-starvation* sehingga siklus sel dapat dihentikan pada fase G₀.^{16,37} Sebagaimana sel-sel donor mamalia, perkembangan siklus sel setelah sitokinesis, sel membutuhkan mitogen (*growth factors*) untuk bisa berkembang sampai fase G₁. Penghilangan *signal* mitotik dengan starvasi serum akan menyebabkan sel yang dalam fase G₁ akan keluar dari siklus sel dan berhenti dalam keadaan tidak membelah dalam kondisi aktivitas metabolis yang rendah yang disebut G₀.²⁶ Sel donor dalam kondisi fase G₀, apabila dipakai sebagai sumber nukleus dalam TNS, nukleus akan lebih mudah dimodifikasi oleh berbagai faktor dari sitoplasma oosit resipien, atau menjadi lebih mudah menangkap *signals* sitoplasma, sehingga memudahkan terjadinya *reprogramming* nukleus.³⁷ Adanya *reprogramming* nukleus ini sangat penting karena tingkat perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS sangat tergantung pada *reprogramming* ekspresi gen oleh faktor-faktor yang ada di sitoplasma, dan G₀ adalah fase siklus sel yang paling sesuai.^{16,37} Selain itu induksi sel donor menjadi fase G₀/G₁ juga dimaksudkan untuk mempertahankan ploidi yang benar dan untuk mencegah kerusakan DNA dari sel rekonstruksi melalui TN.^{37,40}

Sel donor yang dilakukan starvasi serum pada penelitian ini adalah subpasase 3, yang mempunyai ratio sel hidup 79,55 dan setelah dilakukan starvasi serum sampai hari 3 ratio sel hidup masih stabil. Hari selanjutnya (hari 5), ratio sel hidup menurun secara drastis yang berarti ratio kematian sel meningkat. Kematian sel ada 2 tipe. Tipe I atau biasa disebut apoptosis, ditandai dengan kondensasi kromatin menjadi satu massa, sementara sitoplasma masih tampak utuh, namun lama kelamaan juga kondensasi. Perubahan nukleus merupakan proses yang pertama kali nampak. Pemeriksaan elektroforesis DNA terhadap kromatin yang kondensasi menunjukkan adanya fragmentasi. Kematian sel tipe II dimulai dengan peningkatan lisosom, timbulnya erosi pada endoplasmik retikulum dan penurunan sintesa protein. Kondensasi nukleus terjadi lebih lambat. Pemeriksaan mikroskop pembesaran kecil pada stadium awal, nukleus masih nampak relatif normal.⁴¹

Pemeriksaan untuk mengetahui sel hidup atau mati (nekrosis) adalah dengan menggunakan metode pewarnaan Hoechst-44432 yang dikombinasikan dengan *Propidium Iodide* (H-33342-PI). Pewarnaan H-33342 menunjukkan adanya nukleus. Pewarnaan PI menunjukkan kematian sel. Prinsipnya, sel nekrosis yang telah kehilangan integritas membran akan terwarnai merah oleh PI dan sel hidup tidak terwarnai.⁴²

Banyak *signal* yang dapat menyebabkan apoptosis, sebagai contoh over stimulasi dari reseptor sel T, terapi dengan glukokortikoid, virus dan radiasi. Pada *in vitro*, menghilangkan (*withdrawal*) hormon pertumbuhan atau gangguan reseptor hormon pertumbuhan dapat menyebabkan apoptosis.⁴¹ Dengan demikian, banyaknya apoptosis dalam starvasi serum ini bukan disebabkan oleh proses penuaan sel atau pemendekan telomer, tetapi disebabkan sedikitnya hormon pertumbuhan akibat starvasi serum.

Mekanisme terjadinya apoptosis *in vitro* pada kultur sel donor starvasi serum, masih belum jelas apakah lewat jalur ekstrinsik melalui caspase 8 dan 10 atau lewat jalur intrinsik melalui caspase 9 dan 2. Jalur ekstrinsik biasanya terjadi karena kelainan sel selama pertumbuhan, pada pendidikan sistem imun dan pembuangan tumor yang dimediasi sistem imun. Jalur intrinsik biasanya sebagai respon terhadap radiasi ionisasi, obat-obatan kemoterapi dan kerusakan mitokondria.⁴³

Pemeriksaan apoptosis dini pada penelitian ini adalah untuk mendeteksi aktivitas caspase 3, yang merupakan caspase eksekutor bersama dari caspase inisiator apoptosis jalur ekstrinsik maupun ja-

lur intrinsik. Apoptosis melalui jalur ekstrinsik dipicu oleh ligasi dari Fas (juga dikenal sebagai CD95 atau APO-1) yaitu suatu *trans-membrane death receptor* dari superfamili *tumor necrosis factor receptor* tipe1. Sedangkan pada jalur intrinsik, adanya triger kematian sel menyebabkan mitokondria menjadi permeabel secara selektif, menimbulkan pelepasan sitokrom c dan mengaktifkan caspase 9 di dalam bentukan yang disebut *apoptosome*. Selanjutnya caspase 9 aktif, sama dengan caspase 8 aktif mengaktifkan procaspase 3 menjadi caspase 3 aktif yang bertindak sebagai caspase eksekusioner untuk menimbulkan apoptosis.

Starvasi serum untuk menginduksi sel fase G0/G1 yang dipakai dalam penelitian ini adalah starvasi hari 3. Menurut penelitian starvasi serum hari 3 sel fase G0/G1 sebanyak 70,2%; dan hari 5 sebanyak 83,4%.²⁸ Meskipun starvasi hari 5 dapat menghasilkan sel fase G0/G1 lebih banyak, namun karena viabilitasnya menurun tajam dibanding hari 3, yang dipakai adalah starvasi serum hari 3.

Penelitian eksperimental laboratoris pengaruh karakteristik sel donor terhadap perkembangan sel rekonstruksi

TNS yang memakai sitoplasma resipien memungkinkan terjadinya heteroplasmi mitokondria (dua sumber DNA mitokondria berbeda, satu dari sitoplasma resipien, satu dari sel donor) akibat ada tambahan (kontaminasi) mitokondria sel donor. Oosit mamalia berisi sekitar 105 mitokondria.³⁹ Nukleus yang diinsersikan dalam TNS ini bukanlah nukleus fibroblas murni, tetapi fibroblas utuh dipilih yang berukuran $\leq 6 \mu\text{m}$, diambil untuk diinsersikan ke sitoplasma resipien dengan cara diaspirasi menggunakan pipet injeksi ukuran diameter luar 8-10 μm . Pipet injeksi dengan diameter luar 8-10 μm berarti mempunyai lubang sekitar 4-5 μm . Fibroblas yang berukuran 6 μm bila dimasukkan lubang pipet injeksi ukuran 5 μm akan merusak dinding selnya. Dengan demikian, nukleus donor yang dimasukkan ke dalam sitoplasma resipien akan terikut di dalamnya sitoplasma fibroblas yang mengandung mitokondria. Adanya heteroplasmi mitokondria, merupakan potensi timbulnya masalah, namun dari data yang ada belum dapat disimpulkan secara definitif masalah yang ditimbulkan.¹⁰ Sedangkan mitokondria sel donor yang ikut masuk sitoplasma resipien pada TNS secara aktif akan dieliminasi dengan mekanisme yang sama dengan eliminasi mitokondria paternal pada reproduksi seksual. Pada fertilisasi dalam reproduksi seksual, sejumlah mitokondria paternal ikut masuk ke dalam oosit. Mitokondria yang berasal dari paternal selanjutnya

dieliminasi dari zigot pada beberapa pembelahan awal sel dengan mekanisme yang belum jelas sehingga menghasilkan homoplasmi mitokondria maternal.³⁹

Pada apoptosis melalui jalur intrinsik, dimulai dengan kerusakan mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom c.⁴³ Dengan demikian, mitokondria sel donor A yang mempunyai ratio sel hidup lebih tinggi atau apoptosis lebih rendah, diperkirakan mempunyai mitokondria normal lebih banyak dibanding sel donor B yang mempunyai ratio sel hidup lebih rendah atau apoptosis lebih tinggi. Perlu penelitian lebih lanjut apakah heteroplasmi dengan mitokondria yang banyak terjadi kerusakan dapat meningkatkan perkembangan sel rekonstruksi pada stadium awal (4-8 sel) dan menurunkan perkembangan sel rekonstruksi pada stadium lebih lanjut (morula). Penelitian lanjutan tersebut diharapkan juga dapat menjawab pertanyaan, faktor sel donor yang mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi terletak di mana, pada faktor di sitoplasma, di nukleus atau kombinasi keduanya.

Perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS menggunakan sel donor A berbeda secara bermakna dengan sel donor B. Di sisi lain, perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS bergantung pada metilasi DNA. Metilasi DNA berperan di dalam modifikasi *epigenetic imprint*. Sel-sel dalam tubuh mamalia mempunyai isi DNA yang sama sehingga informasi genetiknya sama, tetapi mempunyai diversitas fungsi yang luas. Hal ini disebabkan modifikasi *epigenetic imprint* melalui metilasi.^{39,44} Metilasi DNA sel donor setelah TN, dari analisa regresi antara perkembangan sel rekonstruksi dan DNA metilasi sel donor menunjukkan bahwa jika DNA metilasi sel donor berkurang maka perkembangan sel rekonstruksi meningkat, namun demikian diperlukan lebih banyak penelitian apakah hal ini berbeda secara bermakna. Lebih jauh dinyatakan bahwa analisis metilasi sel donor memungkinkan untuk digunakan sebagai prediksi kemampuan perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS.⁴⁴ Apabila viabilitas sel donor mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS dan metilasi DNA juga mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS, diperkirakan viabilitas sel donor akan mempengaruhi metilasi DNA.

Potensi timbulnya masalah lain dari sel rekonstruksi hasil TNS adalah panjang telomer.¹⁰ Prosedur TNS adalah memakai sel dewasa atau sel yang telah beberapa kali pembelahan sel sebagai donor nukleus. Sebelum dipakai sebagai sumber nukleus donor, perlu dikultur beberapa kali, sehingga perlu dipertanyakan apakah jam mitosis dapat di reset se-

hingga sel rekonstruksi hasil TNS tidak menunjukkan percepatan umur menjadi penuaan dini.³⁹ Panjang telomer berkaitan dengan jumlah pembelahan sel. Sel donor A adalah sel donor subpasase 3 (tidak dilakukan starvasi serum). Sel donor B adalah sel donor subpasase 3 yang telah dilakukan starvasi serum. Pada penelitian ini, diduga panjang telomer awal dari sel donor tidak berperan dalam perbedaan perkembangan sel rekonstruksi karena diperkirakan panjang telomer sel donor A sama dengan sel donor B. Panjang telomer suatu sel rekonstruksi atau zygote hasil fertilisasi normal dapat terjadi restorasi. Telomer dipelihara oleh telomerase. Fungsi dari telomerase adalah mensintesa ulangan 50-TAGGG-30 pada ujung telomer sehingga memulihkan kembali panjang telomere.³⁰ Aktivitas telomerase sel rekonstruksi mulai nampak pada stadium morula.³⁹ Pengaruh akibat adanya perubahan panjang telomer selama perkembangan sel rekonstruksi pada penelitian ini diduga tidak terjadi karena pertumbuhannya sampai stadium morula, tidak ada yang mencapai stadium blastosis.

Sel rekonstruksi yang dihasilkan dalam penelitian ini termasuk kelompok *stem cell* yang totipoten. Sel rekonstruksi dikelompokkan *stem cell* bila mempunyai kemampuan tak terbatas untuk membelah dalam kultur dan mempunyai potensi menjadi sel khusus yang dewasa (*mature specialized cell type*). Sel rekonstruksi juga dikelompokkan sebagai sel totipoten bila mampu untuk membentuk semua jenis sel dari hasil konsepsi, meliputi keseluruhan fetus dan plasenta. Sel totipoten mempunyai kemampuan tak terbatas, mampu membentuk organisme utuh. Hasil jangka panjang penelitian ini diharapkan dapat untuk memproduksi sel sebagai *graft* untuk keperluan terapi *stem cell* yang bersifat pluripoten. Pluripotensi berarti kemampuan untuk membentuk beberapa tipe sel dari ketiga lapisan germinal (ektoderm, mesoderm dan endoderm), tetapi tidak dapat membentuk organisme utuh. *Stem cell* yang sudah ada dalam tubuh merupakan *stem cell* yang multipoten dan mempunyai keterbatasan untuk digunakan sebagai bahan terapi *stem cell* seperti telah disebutkan dalam pendahuluan. *Stem cell* jaringan dikelompokkan sebagai *stem cell* yang multipoten karena mempunyai kemampuan hanya terbatas menjadi sel dan jaringan yang sesuai dengan lokasinya, misalnya *stem cell* darah menjadi sel darah merah, lekosit dan trombosit.⁵

Keberhasilan terjadinya pembelahan sel rekonstruksi sangat bervariasi. TNS menggunakan sel donor starvasi serum ada 3 dari 87 sel rekonstruksi (3,4%) terjadi pembelahan sel. Pada serum standar (*growing cell*) 7 dari 158 sel (4,4%) terjadi pem-

belahan sel.²⁸ Penggunaan sel donor dengan starvasi serum ada 15 dari 45 sel rekonstruksi (33,30%) terjadi pembelahan sel dan pada serum standar (*growing cell*) 15 dari 50 sel (30,0%) terjadi pembelahan sel. Pada penelitian ini dari 125 sel rekonstruksi menggunakan sel donor hasil kultur standar ada 19 (15,2%) terjadi pembelahan sel dan dari 118 sel donor hasil starvasi serum ada 15 (12,7%) terjadi pembelahan sel.³¹

Kultur terhadap sel rekonstruksi hasil TNS teknik IDNI dalam medium dasar TCM199, belum mampu menghasilkan sel yang mencapai blastosis. Penyebab rendahnya tingkat perkembangan sel rekonstruksi dapat disebabkan karena kelainan ekspresi gene yang terjadi selama kultur *in vitro*. Faktor metode kultur juga sangat mempengaruhi tingkat perkembangan.³⁷ Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian lanjutan, bagaimana metode kultur sel rekonstruksi yang paling optimal, untuk memproduksi blastosis dan mengeksplorasi hubungannya dengan viabilitas sel donor.

Pada kelompok sel donor dengan sistem kultur starvasi serum meskipun tingkat pertumbuhannya hanya mencapai tahap 4-8 sel, namun bila dilihat tingkat pembelahannya lebih tinggi. Dari 125 sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor starvasi serum ada 19 (15,2%) yang terjadi pembelahan. Sedangkan sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor kultur standar dari 118 ada 15 (12,7%) yang terjadi pembelahan. Padahal sel donor starvasi serum mempunyai ratio apoptosis yang lebih tinggi dibanding sel donor hasil kultur standar. Sebaliknya sel donor starvasi serum mempunyai ratio sel hidup yang lebih rendah dibanding sel donor hasil kultur standar. Hal ini berarti bahwa tingkat kerusakan sitoplasma sel donor starvasi serum lebih tinggi dibanding sel donor hasil kultur standar. Hasil sebaliknya terjadi pada stadium lebih lanjut (morula). Dari 125 sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor starvasi serum ada 3 (0,8%) yang mencapai morula. Sedangkan sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor kultur standar dari 118 ada 7 (5,93%) yang mencapai 4-8 sel tidak ada yang mencapai morula. Berdasar hal tersebut dapat disimpulkan faktor sitoplasma sel donor berperan di dalam perkembangan sel rekonstruksi.

Faktor apa dari sitoplasma yang mempengaruhi proses *reprogramming* sel rekonstruksi masih belum jelas.¹¹ Apabila perkembangan sel rekonstruksi menggambarkan *reprogramming* sel rekonstruksi,³⁵ sitoplasma sel donor mempengaruhi perkembangan sel rekonstruksi, dan fase siklus sel G0/G1 meningkatkan keberhasilan perkembangan sel rekon-

struksi maka tingkat perkembangan sel rekonstruksi dengan menggunakan sel donor starvasi serum (telah diinduksi menjadi fase G0/G1 dan mempunyai ratio apoptosis lebih tinggi) yang lebih tinggi bukan karena ratio apoptosis atau kerusakan sitoplasma yang lebih tinggi, tetapi karena faktor fase siklus sel (G0/G1). Nukleus diploid (G0 dan G1) sel rekonstruksi yang mengalami perkembangan, akan kondensasi untuk membentuk kromatid tunggal dan menjaga ploidi yang benar, setelah terjadi sekian kali replikasi DNA. Proses PCC akan menyebabkan kerusakan DNA inti bila terjadi saat sel pada fase S (S-phase) dan sebaliknya tidak berpengaruh bila terjadi saat sel pada fase G0, G1 atau G2. Degradasi DNA sel donor mungkin merupakan salah satu faktor yang menyebabkan ketidaknormalan perkembangan sel rekonstruksi hasil TNS.²¹ Berdasarkan data tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa (1) Normalitas sitoplasma sel donor meningkatkan tingkat pertumbuhan sel rekonstruksi pada stadium lanjut (morula). (2) Regulasi perkembangan sel rekonstruksi stadium awal tidak pada tingkat sitoplasma, tetapi pada tingkat nukleus.

Kultur sel donor yang panjang tidak berpengaruh terhadap kemampuan perkembangan sel rekonstruksi, namun bisa menyebabkan terjadinya kenaikan apoptosis blastomer.⁴⁵ Persentase jumlah sel hidup, apoptosis dini dan apoptosis lanjut dari sel donor secara nyata mempengaruhi pembelahan dan pertumbuhan sel rekonstruksi hasil TNS. Dengan demikian dapat diperkirakan bahwa meningkatnya kejadian apoptosis blastomer pada kultur sel donor jangka lama tersebut berkaitan dengan banyaknya apoptosis dari sel donor itu sendiri. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, hubungan apoptosis sel donor dengan tingkat apoptosis dari blastomer.

Aplikasi hasil penelitian untuk terapi stem cell di masa mendatang

Pembahasan berikut ini tidak ada kaitan langsung dengan penelitian yang telah dikerjakan, tetapi berkaitan dengan penelitian lanjutan untuk mencapai tujuan jangka panjang dari penelitian ini.

Konsep terapi *stem cell* dapat merubah teori lama tentang differensiasi sel, khususnya teori adanya jaringan dengan sel yang permanen yang telah terdifferensiasi dan tidak dapat untuk diperbaiki. Populasi dari sel-sel dalam tubuh tidak semuanya mengalami pergantian sel (*turn over*). Beberapa jenis sel, yang telah dibuat dalam jumlah yang cukup selama masa embrio, akan tetap bertahan selama dewasa, tidak mengalami pembelahan dan tidak dapat diganti jika mengalami kerusakan. Dalam hal ini, semua jenis sel saraf adalah permanen. Juga

beberapa jenis sel dari mamalia seperti sel otot jantung, sel-sel pendengaran (*auditory hair cells*) dan sel lensa mata juga permanen. Tetapi, semua jenis sel tersebut mempunyai rentang kehidupan yang sangat panjang dan hidup dalam lingkungan yang terlindungi, serta masih sulit untuk dijelaskan generalisasi alasannya mengapa sel-sel tersebut permanen dan tidak dapat diganti. Untuk sel jantung dan sel pendengaran, masih sulit memberikan alasannya. Sedangkan dalam hal sel saraf, tampaknya pergantian pada masa dewasa akan merugikan karena sulitnya pemulihan pola koneksi saraf yang tepat dan kompleks yang telah dibentuk pada kondisi yang sangat berbeda selama pertumbuhan. Lebih jauh, berbagai memori yang terekam dalam bentuk modifikasi struktur dalam bentuk interkoneksi antara sel-sel saraf akan hilang. Di sisi lain, lensa mata merupakan sel yang permanen hanya karena konsekuensi cara tumbuhnya jaringan yang tidak dapat dihindari.⁴⁶

Mekanisme penyembuhan pada terapi *stem cell* tidak hanya dengan cara penggantian sel yang telah mengalami kerusakan. Apabila mekanisme penyembuhan terapi *stem cell* hanya dengan penggantian sel yang rusak, maka alasan perlunya sel permanen dapat dibenarkan. Namun mekanisme penyembuhan terapi *stem cell*, selain dengan penggantian sel, juga dapat dengan fusi sel atau katalisa sel. Penyembuhan dengan mekanisme fusi sel, maka *stem cell* akan berfusi menjadi satu dengan sel yang diperbaiki sehingga perubahan struktur dan interkoneksi dari sel yang lama dapat dihindari. Dengan demikian, efek yang merugikan seperti tersebut pada penggantian sel saraf dapat dicegah. Mekanisme penyembuhan terapi *stem cell* juga dapat dengan katalisa sel, yaitu *stem cell* mensekresi sitokin-sitokin yang diperlukan untuk reparasi sel yang rusak.

Penyediaan *stem cell* sebagai *graft* untuk terapi penggantian sel dengan metode TNS, memerlukan penyediaan oosit sebagai sitoplasma resipien. Selama ini, pengambilan oosit dari pasien masih ada masalah yaitu memerlukan biaya relatif tinggi dan cara pengambilannya masih tergolong invasif. Permasalahan ini bisa diminimalisir apabila penyediaan oosit bisa diperoleh dari kultur *stem cell*. Telah berhasil mengkultur SE mencit menjadi oogonia yang dapat memasuki meiosis, merekrut sel sekitarnya membentuk struktur seperti folikel. Apabila pembentukan oosit (oogenesis) dapat dilakukan melalui kultur, diharapkan dapat memberikan kontribusi pada berbagai bidang, antara lain interaksi sel somatik dan sel germinativum, differensiasi, TN dan pengembangan terapi infertilitas.⁴⁷

Masalah lain yang perlu diperhatikan untuk mencapai tujuan jangka panjang penelitian ini adalah ba-

gaimana sistem untuk mengarahkan differensiasi SE menjadi *lineage* spesifik *in vitro* yang diperlukan untuk penetapan jenis sel tertentu untuk terapi penggantian sel.⁴⁸ Potensi SE untuk digunakan sebagai sumber sel yang tak terbatas untuk transplantasi sel adalah tergantung pada ketersediaan dan kemurnian sel dan kemampuan mengarahkan differensiasi menjadi sel spesifik *in vitro*.⁸ Penulis lain juga berpendapat sama. Tantangan pengembangan di bidang klinis adalah bagaimana memproduksi dan memperbanyak tipe sel spesifik yang murni (tidak tercampur jenis sel yang lain) dari kultur kompleks yang berisi berbagai jenis sel. Kultur SE tanpa adanya inhibitor differensiasi, misalnya faktor inhibitor leukemia, akan menghasilkan bentukan yang disebut EB. EB adalah struktur multiseluler yang secara spontan ber-differensiasi menjadi sel-sel ektoderm, endoderm, dan mesoderm. Meskipun kemungkinan untuk menjadi sel tertentu akan meningkat dengan pemberian faktor pertumbuhan yang cukup, derajat kemurnian sel secara umum belum memadai untuk diaplikasikan dalam klinis. Yang sangat penting adalah semua pluripoten sel harus dihilangkan dalam kultur sebelum dipakai dalam klinik. Bila tidak, potensi terjadinya teratoma adalah tinggi. Ada kontaminasi satu sel *undifferentiated* saja dapat terjadi pembentukan tumor.^{2,4,9,48}

KESIMPULAN DAN SARAN UMUM

Kesimpulan dan saran umum dari penelitian ini adalah:

- Pemilihan sumber nukleus donor dalam TNS dari suatu subpasase atau starvasi serum, adalah dengan menggunakan sel donor yang dalam tahapan apoptosis awal. Hal ini mengindikasikan masih adanya kecukupan program-program DNA untuk terjadinya *reprogramming*. Namun demikian masih harus dikonfirmasi apakah regulasi hanya semata-mata dilakukan pada tingkat nukleus atau juga ada faktor yang terdapat dalam sitoplasma.
- Perlu diperhatikan bahwa subpasase yang lebih banyak cenderung menurunkan jumlah sel hidup dan meningkatkan jumlah sel abnormal. Untuk tujuan teknis, perlu dikaji lebih lanjut jumlah subpasase ideal yang dipakai sebagai pedoman standar.
- Sel donor dengan ukuran kecil (kurang atau sama dengan 6 μm) menghasilkan tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi dibanding dengan sel donor starvasi. Namun perlu dilihat lebih jauh, mengapa hal ini terjadi.

RUJUKAN

1. Speroff L, Fritz MA. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins 2005
2. Perpich JG. The dawn of genomic and regenerative medicine: new paradigms for medicine, the public's health and society. *Technology in Society* 2004; 26: 405-14
3. Tsai RYL. A molecular view of stem cell and cancer cell self-renewal. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36: 684-94
4. Reubinoff B. Human embryonic stem cells-potential applications for regenerative medicine. *International Congress Series* 2004; 1266: 45-53
5. Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2004; 18: 827-42
6. Koh CJ, Anthony Atala A. Therapeutic cloning applications for organ transplantation *Transplant. Immunology* 2004; 12: 193-201
7. Henningson CT Jr, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003
8. Eiges R, Benvenisty N. A molecular view on pluripotent stem cells. *FEBS Letters* 2002; 529: 135-41
9. Strom TB, Field LJ, Ruediger M. Allogeneic Stem Cells, Clinical Transplantation and the Origins of Regenerative Medicine. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 3044-9
10. Wolf DP, Mitalipov S, Robert B, Norgren Jr. Nuclear Transfer Technology in Mammalian Cloning. *Archives of Medical Research* 2001; 32: 609-13
11. Hansis C, Barreto G, Maltry N, Niehrs C. Nuclear Reprogramming of Human Somatic Cells by Xenopus Egg Extract Requires BRG1. *Current Biology* 2004; 14: 1475-80
12. Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2003; 14: 93-100
13. Tsukada N, Kudo K, Budiman M, Yamamoto A, Higuchi T, Kobayashi M, Sato K, Oishi K, Lida K. Development of Automated Nuclear Transplantation system. *J Mamm Ova Res* 2003; 18: 106-9
14. Jouneau A, Renardy JP. Reprogramming in nuclear transfer. *Current Opinion in Genetics and Development* 2003; 13: 486-91
15. Hozumi T. *Reproductive Biology and Biotechnology*. Japan International Cooperation Agency Indonesia Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing Inc. 3rd ed. 2001
16. Campbell KHS, McWhir J, Richie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64-6
17. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-13

18. Yu YS, Sun XS, Jiang HN, Han Y, Zhao CB, Tan JH. Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblast in goats: work in progress. *Theriogenology* 2003; 59: 1277-89
19. Urakawa M, Ideta A, Sawada T, Aoyagi Y. Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells. *Theriogenology* 2004; 62: 714-28
20. Kühholzer-Cabot B, Brem G. Mini-Review Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer. *Experimental Gerontology* 2002; 37: 1315-21
21. Peura TT. Serum starvation can cause excessive DNA damage in sheep fetal fibroblasts. *Proceeding of the Animal conference International Embryo Transfer Society. Omaha, Nebraska, USA. Abstract: Theriogenology* 2001; 258: 13-6
22. Rubin H. Cell aging in vivo and in vitro. *Mechanisms of Ageing and Development* 1997; 98: 1-35
23. Zakharchenko V, Stojkovic M, Brem G, Wolf E. Karyoplast-cytoplasm volume ratio in Bovine Nuclear Transfer Embryos: Effect on Developmental Potential. *Mol Reprod Dev*, 1997; 48: 332-8
24. Atabay EC, Martinez-Diaz MA, Dochi O, Takahashi Y. Factors affecting Enucleation Rates of Bovine and Poecine Oocytes After Removal of Cumulus Cells by Vortexing. *J Reprod and Dev*. 2001; 47: 365-71
25. Nour MMS, Ikeda K, Takahashi Y. Bovine nuclear transfer using cumulus cells derived from serum-starved and confluent cultures. *J Reprod and Dev*. 2000; 46: 85-92
26. Reggio BC. Production of Transgenic Goat by Somatic Cell Nuclear Transfer. Dissertation. Department of Animal Science, Louisiana State University, USA 2002: 8-25
27. Sutovsky P, Prather RS. Nuclear remodeling after SCNT: a contractor's nightmare. *TRENDS in Biotechnology* 2004; 22
28. Das SK, Majumdar AC, Taru Sharma G. In vitro development of reconstructed goat oocytes after somatic cell nuclear transfer with fetal fibroblast cells. *Small Ruminant Research* 2003; 48: 217-25
29. Cho JK, Lee BC, Park JI, Lim JM, Shin SJ, Kim KJ, Lee BD, Hwang WS. Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. *Theriogenology* 2002: 1819-28
30. Kühholzer-Cabot B, Brem G. Mini-Review Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer. *Experimental Gerontology* 2002; 37: 1315-21
31. Tao T, Machaty Z, Boquest AC, Day BN, Prather RS. Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into in vitro matured oocytes. *Animal Reproduction Science* 1999; 56: 133-41
32. Shiga K, Fujita T, Hirose K, Sasae Y, Nagai T. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese Black Bull. *J Theriogenology* 1999; 52: 527-35
33. Keefer CL, Baldassarre H, Kayston R, Wang B, Bathia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downwy BR, Lazaris A, Karatzas CN. Generation of Dwarf Goat (*Capra hircus*) Clones Following Nuclear Transfer with Transfected and Non Transfected Fetal Fibroblast and In Vitro-Matured Oocytes. *J of Biology of Reproduction* 2001; 64: 849-56
34. Zakharchenko V, Stojkovic M, Brem G, Wolf E. Karyoplast-cytoplasm volume ratio in Bovine Nuclear Transfer Embryos. Effect on Developmental Potential. *Mol Reprod Dev*. 1997; 48: 332-8
35. Fulka J Jr, Loi P, Ledda S, Moor RM, Fulka J. Nucleus transfer in mammals: How the oocyte cytoplasm modifies the transferred nucleus. *Theriogenology* 2001; 55: 1373-80
36. Martin BM. *Tissue Culture Techniques. An Introduction.* Birkhauser Boston 1994
37. Campbell KHS. Nuclear transfer in farm animal species. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1999; 10: 245-52
38. Yang X, Tian XC. Cloning Adult Animals-What is the Genetic Age of the Clones? *Cloning* 2000; 2
39. Mollard R, Denham M, Trounson A. Technical advances and Pitfalls on the way to human cloning. *Differentiation* 2002; 70: 1-9
40. Vacková I, Engelová M, Marinov I, Tománek M. Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine. *Animal Reproduction Science* 2003; 77: 235-45
41. Holbrook NJ, Martin GR, Lockshin RA. *Cellular Aging and Cell death.* Wiley-Liss. Inc. 1996
42. Anonymus. Measuring Apoptosis and Necrosis by dual laser flow cytometry. [//cyto.mednet.ucla.edu/protocols/simultan.html](http://cyto.mednet.ucla.edu/protocols/simultan.html) 2005: 1-5
43. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003; 15: 725-31
44. Jones KL, T. Shin, L. Liu. Analysis of donor cell DNA methylation as predictor of blastocysts development after nuclear transplantation. *Proceeding of the Animal conference International Embryo Transfer Society. Omaha, Nebraska, USA. Abstract: Theriogenology* 2001; 272: 13-6
45. Jang G, Park ES, Cho JK, Bhuiyan MMU, Lee BC, Kang SK, Hwang WS. Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in somatic cell nuclear transfer embryo reconstructed with long-term cultured donor cells. *Theriogenology xxx.xxx-xxx.* www.sciencedirect.com. Article in press 2004
46. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell.* Garland Publishing Inc. 3rd ed. 1994
47. Hubner K, Fuchrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, Fuente RDL, Wood J, Strause II JS, Boiani M, Schöler HR. Derivation of oocytes from Mouse Embryonic Stem Cell. *Science* 2003; 300
48. Conley BJ, Young JC, Trounson AO, Mollard R. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004; 36: 555-67