

# Perkembangan Sel Punca Mesenkimal Melalui Kultur Primer Eksplan Wharton's Jelly Tali Pusat Sapi

(Development of Calf Mesenchymal Stem Cells through Wharton's Jelly Umbilical Cord Explant Primary Culture)

Riris Lindiawati Puspitasari<sup>1</sup>, Wahono Esthi Prasetyaningtyas<sup>2</sup>, Mawar Subangkit<sup>3</sup>, Arief Boediono<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Departemen Patologi dan Klinik, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor

\*Penulis untuk korespondensi: ab@apps.ipb.ac.id

Diterima: 31 Januari 2024, Disetujui: 31 Januari 2024

## ABSTRAK

Saat ini penggunaan sel punca mesenkimal Wharton's jelly (SPMWJ) sapi dapat menjadi alternatif bagi terapi *pet animals*. Manfaat SPM antara lain meregulasi sinyal sel, rendahnya penolakan sistem imun pada pemberian alogenic, tidak adanya resiko keganasan, stabil penyimpanannya, dan mudah transportasinya. Kultur tali pusat sapi belum dilaporkan perkembangan eksplan WJ terutama proses pertumbuhan eksplan WJ mulai dari *attach* hingga sel konfluen. Tujuan penelitian adalah menentukan perkembangan eksplan WJ tali pusat sapi. Faktor yang dilihat diantaranya *attachment* eksplan, munculnya *outgrowth*, morfologi sel, dan konfluensi sel. Eksplan mampu *attach* sebanyak 42% pada hari ke-8 kultur dan 88% (hari ke-12). *Outgrowth* sel teramati pada 45% eksplan (hari ke-8) dan 100% (hari ke-12). Morfologi sel yang terlihat adalah fibroblastik. Konfluensi sel didapat pada hari ke-12, hari ke-16, dan hari ke-20 yaitu 3%, 83%, dan 100%.

**Kata kunci:** attachment, sel punca mesenkimal, outgrowth, Wharton's jelly

## ABSTRACT

Currently, the use of calf mesenchymal stem cell Wharton's jelly (MSCWJ) could be an alternative for pet animal therapy. The benefits of MSC included regulating cell signaling pathways, low immune system rejection in allogeneic administration, no risk of malignancy, stable storage, and easy transportation. Calf umbilical cord culture had not been reported on the development of WJ explants, especially the growth process of WJ explants from *attach* to confluent. The aim of the study was to determine the development of calf umbilical cord WJ explants. Factors examined included explant attachment, outgrowth appearance, cell morphology, and cell confluence. Explants were able to attach as much as 42% on day 8 of culture and 88% (day 12). Cell outgrowth was observed in 45% of explants (day 8) and 100% (day 12). The visible cell morphology was fibroblastic. Cell confluence was obtained on day 12, day 16, and day 20 at 3%, 83%, and 100%, respectively.

**Keywords:** attachment, mesenchymal stem cell, outgrowth, Wharton's jelly

## PENDAHULUAN

Terapi berbasis sel telah mengalami perkembangan yang pesat dalam beberapa tahun terakhir. Potensi terapi sel untuk mengganti sel tubuh yang rusak memberikan harapan guna menyembuhkan berbagai penyakit. Transplantasi sel punca merupakan salah satu terapi sel yang menjanjikan. Kemampuan sel punca untuk berdiferensiasi dan mensekresikan senyawa bioaktif telah diteliti pada berbagai macam penyakit (Gugjoo 2022).

Sel punca dewasa antara lain sel punca hematopoietik, sel punca neuronal, dan sel punca mensesimal (SPM). Sumber SPM dapat diisolasi dari banyak jaringan seperti korda umbilikal (Hassan et al. 2017), jaringan ekstra embrionik (Marcus dan Woodbury 2008), dan jaringan dewasa lainnya (Xu et al. 2013). Mekanisme terapi SPM dapat diberikan secara langsung dengan mengganti sel yang rusak. Selain itu, pemberian SPM dapat memicu terjadinya revaskularisasi dan memodulasi reaksi inflamasi (Xu et al. 2013). Studi pada hewan menunjukkan bahwa SPM dapat bermigrasi ke jaringan yang rusak. Komponen sekresi SPM diantaranya adalah faktor tumbuh, kemokin, dan protein anti inflamasi (Bai et al. 2016).

Sapi sebagai salah satu hewan besar memiliki banyak manfaat, juga digunakan dalam penelitian terapeutik. Terapi berbasis produk sel memungkinkan penggunaan sel punca alogenik bahkan xenogenik agar pemanfaatannya lebih banyak. Sumber SPM pada sapi berasal dari bagian tubuh yaitu sumsum tulang dan jaringan adiposa (Bosnakovski et al. 2005), cairan amnion (Lu et al. 2014), darah tali pusat (Raoufi et al. 2011), *yolk sac* embrio (Mançanares et al. 2015), dan beberapa jaringan lainnya (Merlo et al. 2022). Kemampuan SPM yang kompleks melalui mekanisme parakrin dapat mengatasi berbagai penyakit termasuk penyakit respirasi. Hal tersebut disebabkan SPM mampu mencegah reaksi inflamasi, mensekresikan antioksidan, berdiferensiasi menjadi sel epitel, mencegah apoptosis, dan menghambat fibrosis jaringan paru (Gugjoo 2022).

Sel punca mensekresikan berbagai molekul terlarut yang berperan dalam terapi suatu penyakit (Harrell et al. 2020). Molekul terlarut tersebut terkandung dalam *conditioned medium* (CM) antara lain *vascular endothelial growth factors* (VEGF) (Zisa et al. 2009), kolagen (Sunarto et al. 2020), dan faktor tumbuh terkait transplantasi (Sagaradze et al. 2019). Penelitian (Wang et al. 2020) menunjukkan bahwa penggunaan CM pada terapi *acute lung injury* (ALI) dan *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) dapat menurunkan infiltrasi sel akibat inflamasi, memperbaiki permeabilitas paru, menurunkan mediator pro inflamasi, dan meningkatkan mediator

anti inflamasi. Kandungan CM antara lain molekul anti inflamasi, molekul pro regenerasi, dan molekul atau ligan kemoatraksis (Putra 2019). Penelitian (Sumapraja et al. 2021) menyebutkan bahwa kandungan protein yang disekresikan oleh SPM tali pusat mampu meningkatkan performa sel granulosa.

Korda umbilikal atau tali pusat sapi merupakan salah satu jaringan yang sering tidak lagi digunakan. Jaringan tersebut merupakan sumber SPM yang mudah didapat secara non invasif. *Wharton's jelly* (WJ) merupakan matriks diantara pembuluh darah tali pusat yang memiliki populasi sel dengan karakter sel punca yaitu mampu self renewal dan berdiferensiasi menjadi tipe sel lain (Weiss et al. 2008; T.C. Cardoso et al. 2012). Eksplan merupakan bagian kecil dari jaringan yang dapat dikultur pada lingkungan yang sesuai agar didapat sejumlah sel. Penelitian (Hassan et al. 2017) menyatakan bahwa eksplan tali pusat yang digunakan berukuran 5 mm<sup>2</sup> dapat menumbuhkan sel fibroblastik dengan karakter multipotensi positif.

Namun pada tali pusat sapi belum dilaporkan proses pertumbuhan eksplan WJ mulai dari penempelan hingga konfluensi. Penelitian ini mendeskripsikan perkembangan eksplan WJ asal tali pusat sapi sebagai sumber SPM yang berpotensi dalam terapi. Manfaat penelitian yaitu dapat mendukung pengembangan protokol kultur SPMWJ sehingga meningkatkan keberhasilan terapi pada veteriner.

## BAHAN DAN METODE

### Kaji Etik

Prosedur penanganan hewan telah terdaftar di Komisi Etik Hewan SKHB IPB dengan nomor 141/KEH/SKE/XII/2023. Jumlah hewan yang digunakan yaitu 2 ekor sapi betina bunting (sebagai donor tali pusat).

### Koleksi Tali Pusat Sapi

Tali pusat dikoleksi dari sapi betina yang melahirkan secara alami di peternakan sekitar kota Bogor, Jawa Barat. Prosedur menangani tali pusat mengikuti (Hendijani et al. 2014; Dias et al. 2016; Debbarma et al. 2020). Tali pusat dipisahkan dari plasenta dan dipotong sepanjang 6 sampai 10 cm yang dilakukan oleh dokter hewan. Bagian tersebut lalu dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS), *penicillin streptomycin* (penstrep) 100 U/mL, dan amphotericin B 0,25 µg/mL. Tali pusat dibawa ke laboratorium menggunakan wadah dingin lalu diberi label < 7 jam dan > 7 jam.

### Kultur Primer

Proses pembersihan tali pusat mengikuti (Cardoso *et al.* 2012) dengan penambahan perendaman di dalam larutan iodine 0,5% (Pawitan *et al.* 2014). Potongan tali pusat diproses di dalam *biosafety cabinet*, dibilas sesaat dalam larutan iodine, dan dicuci sebanyak 3 kali untuk menghilangkan sisa darah maupun iodine menggunakan larutan DPBS. Bagian WJ merupakan jaringan berwarna putih di sekitar arteri dan vena kemudian dipotong menggunakan gunting hingga berukuran  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$  lalu dibilas dengan medium kultur. Potongan WJ tersebut digunakan sebagai eksplan pada kultur primer selanjutnya. Eksplan ditempatkan dalam wadah kultur 24 well sebanyak 1 eksplan tiap well. Wadah kultur disiapkan terlebih dulu dengan melapisi menggunakan gelatin 0,1% selama semalaman pada  $4^\circ\text{C}$ . Medium kultur terdiri atas *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) 4500 mg/L glukosa, *fetal bovine serum* (FBS) 10%, penstrep 100 U/mL, amphotericin B 0,25  $\mu\text{g/mL}$ , L-glutamin, dan asam amino non esensial 0,1%. Kultur dipelihara dalam inkubator dengan kondisi  $\text{CO}_2$  5% dan suhu  $37^\circ\text{C}$  (Debbarma *et al.* 2020). Pada saat inisiasi penempelan eksplan pada dasar wadah kultur, medium yang digunakan sebanyak 250  $\mu\text{L}$  dan dibiarkan selama 4 hari. Medium ditambahkan hingga 500  $\mu\text{L}$  pada hari ke-5. Penggantian medium dilakukan setelah terlihat pertumbuhan sel di sekitar eksplan dan setiap 3-4 hari sekali. Pengamatan menggunakan mikroskop *inverted* Olympus Ix70 dan kamera Olympus CX31+, perbesaran 40x dan 100x.

### Pertumbuhan Eksplan

Sel mencapai pertumbuhan yang hampir memenuhi area wadah kultur atau *confluency* setelah 12 hari. Sel diisolasi menggunakan tripsin-EDTA 0,25% untuk

dilepaskan dari dasar wadah kultur. Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  sel diencerkan dengan 5  $\mu\text{L}$  *tryphan blue* lalu dihitung menggunakan haemositometer dan mikroskop cahaya perbesaran 10x.

### Analisis Data

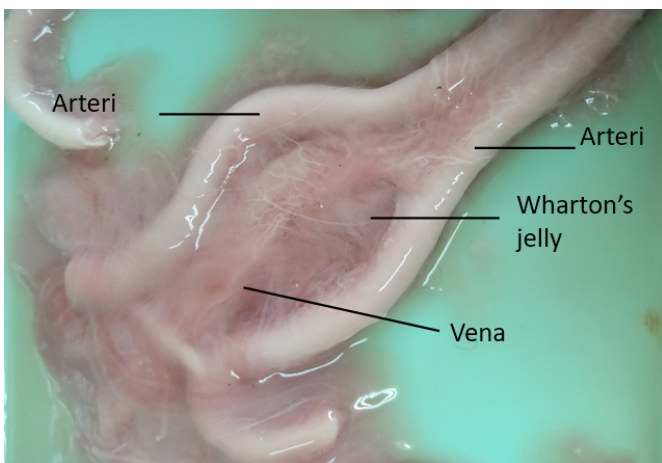
Data hasil penelitian berupa foto perkembangan eksplan. Data dibahas secara deskriptif terhadap kemampuan menempel eksplan, pertumbuhan sel, dan *confluency* sel.

## HASIL

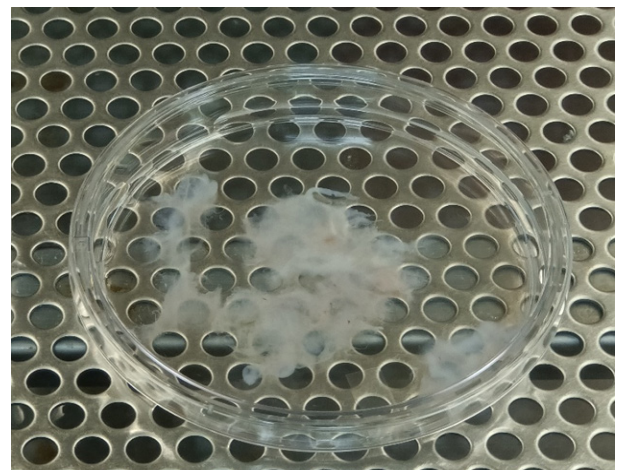
### Wharton's jelly Tali Pusat Sapi

Tali pusat didapat dari sapi betina jenis Peranakan Ongole (PO) berusia 3 tahun yang melahirkan secara spontan. Tali pusat masih dalam keadaan segar, tidak berbau, dan banyak mengandung darah. Gambar 1 menunjukkan anatomi tali pusat sapi yang terdiri atas 2 arteri umbilikal, 2 vena umbilikal, jaringan WJ, dan selaput. Arteri memiliki diameter lebih besar, dinding lebih tebal, dan elastis. Vena berdiameter lebih kecil, dinding tipis, dan kurang elastis. Selain itu juga terlihat adanya percabangan arteri maupun vena. Selaput atau membran menyelubungi keseluruhan tali pusat. Pada selaput juga ditemukan kapiler darah sehingga perlu dipisahkan pada proses isolasi WJ. Secara keseluruhan, tali pusat sapi memiliki struktur yang menyebar dan rata, tidak seperti tali pusat manusia yang memiliki bentuk melingkar dengan batas jelas seperti yang dijelaskan oleh (Kusindarta dan Wihadmadyatami 2021).

*Wharton's jelly* merupakan matriks gelatin yang melindungi vena dan arteri tali pusat (Gambar 2).



Gambar 1 Potongan tali pusat sapi yang akan diproses



Gambar 2 Bagian Wharton's jelly sebagai eksplan kultur primer sel punca mesenkimal sapi

Berdasarkan (Varaa et al. 2019) WJ adalah jaringan konektif yang banyak mengandung sel fibroblas, kolagen, asam hyaluronat, dan air. Komposisi inilah yang menyebabkan WJ tampak seperti massa lunak, berwarna putih, dan berlendir saat pemotongan.

**Kultur Primer**

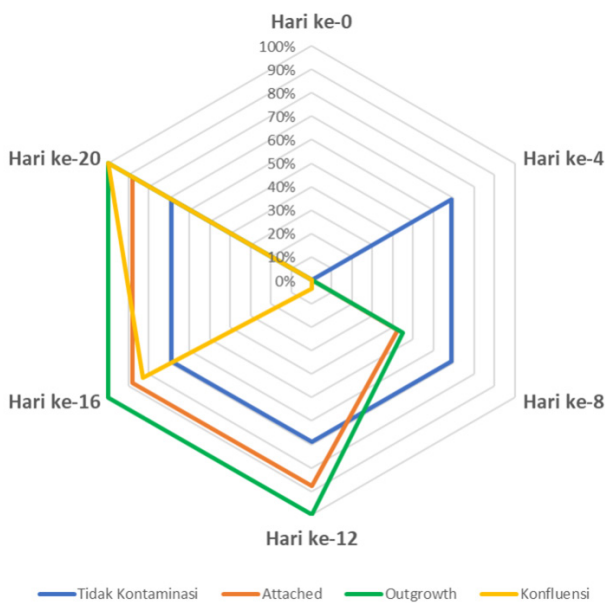
Eksplan WJ yang dapat dikoleksi dari tali pusat sapi sebanyak 50 potongan kecil dan dipilih yang berukuran 1 x 1 x 1 mm<sup>3</sup>. Eksplan diperoleh sebanyak 48 potong. Eksplan merupakan bagian dari jaringan dan sebagai material awal dalam kultur primer yang diharapkan dapat menumbuhkan sel. Gambar 3 memperlihatkan beberapa tahapan perkembangan kultur. Kultur dapat dinilai berdasarkan adanya kontaminasi, pertumbuhan eksplan, perkembangan, dan viabilitas sel. Kultur sel yang sehat dapat berkembang hingga mencapai konfluensi. Konfluensi merupakan kondisi sel yang tumbuh bertambah banyak hingga menutupi seluruh area wadah kultur (Jaccard et al. 2014).

Secara keseluruhan terdapat 33 eksplan (69%) yang tidak terkontaminasi dan mampu berkembang hingga mencapai konfluensi. Kontaminasi pada 31% eksplan teramati pada hari ke-4 kultur. Sebanyak 5 eksplan (10,4%) terkontaminasi bakteri dengan ciri antara lain medium menjadi keruh, warna medium berubah kekuningan, dan terlihat adanya bakteri bentuk batang dengan mikroskop. Sementara itu sebanyak

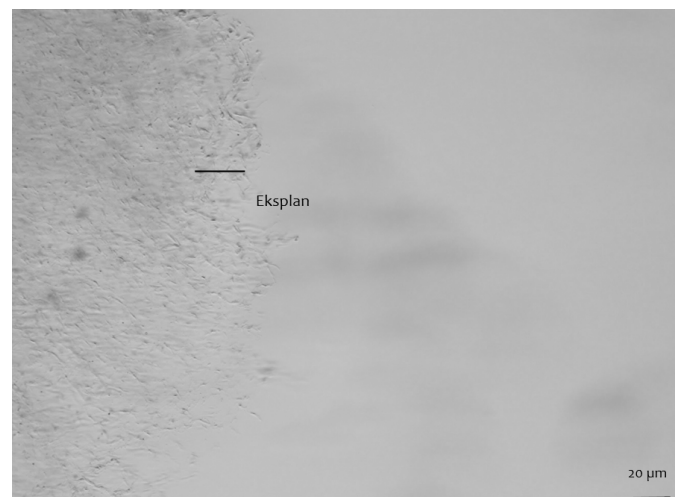
10 eksplan (20,8%) terkontaminasi fungi yang ditandai dengan adanya hifa atau miselium dan warna medium menjadi kekuningan.

Eksplan membutuhkan waktu agar dapat tumbuh dalam medium dan kondisi fisik kultur. Setelah hari ke-4 eksplan sudah tidak ada lagi yang terkontaminasi. Tahapan selanjutnya eksplan akan menggunakan nutrisi yang ada untuk berkembang. Pada hari ke-5 eksplan mulai menempel pada wadah kultur yang ditandai dengan sudah tidak ikut bergeser saat wadah digoncangkan. Penempelan atau *attachment* biasanya berawal di area tengah eksplan. Penempelan merupakan tahapan awal eksplan agar dapat tumbuh sel (Skiles et al. 2018). Gambar 3 menunjukkan bahwa sebanyak 14 eksplan (42%) mampu menempel pada hari ke-8 kultur. Pergantian medium memberikan efek positif terhadap komposisi nutrisi dan keseimbangan pH medium kultur. Hal ini terlihat dengan bertambahnya jumlah eksplan yang menempel. Pada hari ke-12 didapatkan 29 eksplan (88%) menempel dan terus berkembang dengan baik. Sementara itu terdapat 4 eksplan yang tidak menempel hingga akhir kultur (Gambar 4). Masih rendahnya jumlah eksplan menempel sebelum hari ke-8 menginformasikan bahwa adanya faktor penghambat misalnya kondisi penyimpanan eksplan yang belum tepat dan masih ditemukan kontaminasi pada beberapa hari awal kultur.

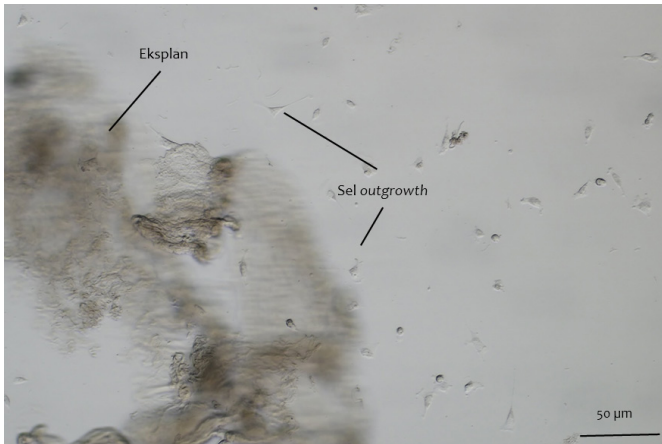
Eksplan yang telah menempel kemudian tumbuh sel di sekitarnya (*outgrowth*). Gambar 3 memperlihatkan adanya *outgrowth* pada hari ke-8 sebanyak 13 eksplan (45%). Jumlah eksplan *outgrowth* bertambah menjadi 29 eksplan (100%) pada hari ke-12. Namun demikian terdapat pula *outgrowth* yang teramati pada hari ke-6 (Gambar 5). *Outgrowth* memberikan informasi bahwa sel dalam kondisi optimum untuk tumbuh. Sel tersebut memiliki bentuk fibroblas (Gambar 6) dengan ciri yaitu



Gambar 3 Perkembangan eksplan Wharton's jelly tali pusat sapi pada medium kultur (N awal =48 eksplan; N tidak kontaminasi=33 eksplan; N attached/menempel =33 eksplan; N outgrowth=29 eksplan; N konfluensi=29 eksplan).



Gambar 4 Eksplan Wharton's jelly belum menempel pada hari ke-5 kultur



Gambar 5 Pertumbuhan sel outgrowth pada hari ke-6 kultur



Gambar 6 Sel konfluensi pada hari ke-13 kultur. Sel tampak memiliki bentuk fibroblas

memiliki penjurusan sitoplasma di kedua ujungnya (*fibroblast like spindle*) (Hassan *et al.* 2017).

Konfluensi merupakan karakteristik pertumbuhan sel yang optimum. Sel akan bertambah jumlah dan tumbuh menutupi sebagian besar permukaan wadah kultur. Gambar 3 menjelaskan bahwa konfluensi dapat tercapai pada 1 eksplan (3%) di hari ke-12, 24 eksplan (83%) di hari ke-16, dan 29 eksplan (100%) di hari ke-20 kultur. Konfluensi menjadi tanda bahwa kultur dapat dibagi menjadi beberapa bagian agar didapat kepadatan sel yang sesuai (*pasase*). Gambar 6 memperlihatkan kultur telah mencapai konfluensi 80% pada hari ke-13 kultur. Koloni sel fibroblas tumbuh memenuhi wadah kultur secara monolayer (1 lapisan). Karakter pertumbuhan sel demikian merupakan ciri SPM diantaranya sel fibroblas, monolayer, dan menempel pada wadah kultur (Lara *et al.* 2017).

## PEMBAHASAN

### *Wharton's jelly Tali Pusat Sapi*

Gambar 1 memberikan penjelasan mengenai anatomi tali pusat sapi yang digunakan pada penelitian. Pada mamalia, tali pusat merupakan struktur yang menghubungkan plasenta dengan fetus dalam menyediakan sumber makanan. Perbedaan struktur tali pusat antara manusia dan hewan mamalia lainnya terletak pada anatomi bagian penyusunnya.

Tali pusat manusia memiliki panjang 40-60 cm dengan ketebalan 1-2 cm. Lapisan terluar berupa epitel amnion yang membungkus jaringan ikat mukoid, dengan 3 pembuluh yaitu 1 vena dan 2 arteri. Pembuluh tersebut membawa darah beroksigen dan terdeoksigenasi antara plasenta serta fetus. Arteri dan vena umbilikal tidak memiliki tunika adventisia. Tidak adanya tunika adventisia pada pembuluh tali pusat dapat terganti oleh jaringan ikat mukoid

(*Wharton's jelly*). *Wharton's jelly* tidak mengandung pembuluh darah, pembuluh getah bening, dan jaringan saraf. Hal tersebut terlihat pada Gambar 2. Hasil penelitian (Gogjel *et al.* 2003) menyebutkan bahwa WJ merupakan jaringan ikat sederhana yang berbeda dengan cairan atau rangka dan dianggap sebagai jaringan ikat berlendir (mukoid). Jaringan ikat memiliki matriks dengan komponen serat yaitu kolagen dan WJ mengandung kolagen I kondroitin atau proteoglikan.

Tali pusat beberapa hewan berbeda dengan manusia. Pada kuda terdapat 4 pembuluh (2 arteri dan 2 vena) yang bercabang. Struktur tersebut juga dijumpai pada tali pusat anjing. Struktur serupa juga didapatkan pada sapi (Gambar 1). Perbedaan lainnya yaitu pada tali pusat kuda memiliki tunika adventisia, sementara manusia tidak ditemukan (Davies *et al.* 2017).

Jaringan asal fetus dan induknya seperti tali pusat, membran amnion, lempeng korionik dan desidua parietalis merupakan jaringan yang kaya SPM. Hal ini menyebabkan jaringan tersebut dimanfaatkan pada terapi berbagai penyakit (Dueñas *et al.* 2014). Beberapa keuntungan mengoleksi jaringan tersebut antara lain non invasif, jumlah SPM yang lebih tinggi dibandingkan jaringan dewasa, proliferasi baik secara *in vitro*, dan kapasitas engraftmen tinggi (Nogami *et al.* 2012; Joel *et al.* 2019). Seperti pada SPM asal jaringan lainnya, SPM asal tali pusat memiliki morfologi sel fibroblas dan dapat mengekspresikan penanda multipotensi (Parolini *et al.* 2008).

### *Kultur Primer*

Kultur primer merupakan metode untuk menginisiasi sel agar mampu berproliferasi di dalam medianya. Pada periode tersebut, kultur memiliki sel yang heterogen. Tahap awal kultur primer tali pusat

sapi ditemukan adanya beberapa tipe sel yaitu sel hemosit dan endotelial kemudian tumbuh sel bentuk fibroblas (Xiong *et al.* 2014). Berbagai pendekatan telah dirancang untuk mengisolasi tali pusat yaitu metode enzimatik dan eksplan. Metode enzimatik menggunakan tripsin, kolagenase maupun hialuronidase yang dapat mencerna jaringan dan melepaskan sel dari matriks ekstraselulernya. Waktu inkubasi yang cukup lama antara 30 menit hingga 16 jam untuk melisiskan sel dapat mengubah fenotip sel dan menghambat penempelan sel pada wadah kultur (Hassan *et al.* 2017). Sementara itu metode eksplan lebih mudah dilakukan dengan keberhasilan yang tinggi dan jumlah sel lebih banyak (Yoon *et al.* 2013). Hal tersebut dikarenakan lebih sedikitnya kerusakan sel dan eksplan sehingga dapat melepaskan faktor tumbuh tertentu yang lebih tinggi (Pawitan *et al.* 2014).

Isolasi SPM tali pusat dengan metode eksplan dapat meminimalkan tekanan dan kerusakan terhadap sel (Hendijani 2017). Eksplan memiliki populasi SPM yang lebih homogen dibanding metode enzimatik. Eksplan tali pusat menghasilkan sel klonogenik yang memiliki karakter SPM seperti morfologi, imunofenotip, kinetika proliferasi, potensi diferensiasi dan aktivitas immunosupresif (Hua *et al.* 2014). Pemanfaatan metode eksplan untuk keperluan terapeutik telah ditunjukkan oleh (Skiles *et al.* 2020) yang menjelaskan bahwa jaringan tali pusat yang dikultur menggunakan eksplan menghasilkan karakteristik SPM yang optimum. Penelitian tersebut juga memperlihatkan bahwa tali pusat setelah kriopreservasi memberikan profil SPM yang sama dengan tali pusat segar. Gambar 3 menjelaskan bahwa penempelan eksplan menentukan lamanya waktu yang dibutuhkan hingga sel konfluensi. Proses pemeliharaan kultur rutin seperti penambahan medium dan pengamatan dapat memicu adanya tekanan terhadap sel terutama pada 3 hari di awal kultur.

Gambar 3 menunjukkan eksplan mampu menempel pada hari ke-8 sebanyak 42%. Hasil penelitian lain melaporkan adanya penempelan eksplan pada hari ke-10 kultur membran amnion kelinci (Minin *et al.* 2022). Setelah eksplan menempel maka sel akan tumbuh menyebar di sekitarnya dan berproliferasi (Chen *et al.* 2013). Tahapan selanjutnya sel akan konfluensi. Salah satu cara meningkatkan penempelan sel yaitu dengan menggunakan ekstra seluler matriks (ECM). Pemberian ECM akan mengoptimalkan perlekatan, migrasi, proliferasi, dan diferensiasi sel punca. Contoh ECM antara lain laminin, fibronektin, kolagen tipe I dan IV, matrigel, serta hidrogel sehingga dapat memperbaiki

lingkungan tumbuh sel punca (Choi *et al.* 2014).

Fibroblas merupakan sel yang menyintesis kolagen, menyusun jaringan dan organ pada hewan atau manusia, serta mampu menempel pada wadah kultur seperti sifat SPM (Lv *et al.* 2014). Kultur endometrium sapi menghasilkan koloni SPM dengan ciri memiliki bentuk sel fibroblas, mampu menempel pada wadah kultur, dan mengekspresikan marker multipotensi (de Moraes *et al.* 2016). Sel-sel dalam kultur primer mulai tumbuh di area luar eksplan setelah hari ke-3. Sel yang diisolasi dari eksplan matriks tali pusat menunjukkan morfologi sel yang heterogen termasuk bentuk fusiform atau spindle dan bulat kecil (Singh *et al.* 2013). Pada penelitian tampak pertumbuhan sel heterogen (fibroblastik dan bulat kecil) (Gambar 5). Penelitian lain menginformasikan bahwa mengkultur tali pusat manusia membutuhkan waktu 24 jam hingga tampak sel fibroblas (Cheng *et al.* 2017). Perbedaan tersebut berada pada komposisi medium kultur dan jenis ECM yang digunakan.

Konfluensi tampak seperti sel-sel yang tersusun paralel, berukuran kecil dan morfologi seragam. Sebelum sel berhenti tumbuh, terjadi perubahan morfologi dari fibroblas menjadi bentuk tidak beraturan dan ukuran sel membesar. Kondisi tersebut menyebabkan proliferasi sel menurun (Singh *et al.* 2013). Pada penelitian, kultur dipelihara hingga tercapai konfluensi yaitu hari ke-16 (Gambar 3). Penambahan lama kultur setelah sel konfluen ternyata dapat mengubah morfologi sel. Perubahan tersebut terkait dengan mekanisme penuaan dan diferensiasi spontan. Justifikasi ini perlu dikonfirmasi dengan menentukan karakter fenotipik sel menggunakan penanda permukaan multipotensi (Sampaio *et al.* 2015). Proliferasi SPM dapat ditingkatkan dengan menggunakan medium pertumbuhan spesifik, konsentrasi serum dinaikan, penambahan faktor pertumbuhan, dan penghambat diferensiasi (Naeem *et al.* 2022).

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa eksplan Wharton's jelly tali pusat sapi mengalami pertumbuhan yaitu eksplan mampu menempel sebanyak 42% pada hari ke-8 kultur dan 88% (hari ke-12). *Outgrowth* sel teramati pada 45% eksplan (hari ke-8) dan 100% (hari ke-12). Morfologi sel yang terlihat adalah sel fibroblas. Konfluensi sel didapat pada hari ke-12, hari ke-16, dan hari ke-20 yaitu 3%, 83%, dan 100%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada

Kemdikbudristek yang telah memberikan kesempatan memperoleh dana penelitian pada skema Penelitian Disertasi Doktor 2023 dengan nomor kontrak 102/E5/PG.02.00.PL/2023. Selain itu juga kepada laboratorium Embriologi SKHB IPB yang telah menyediakan fasilitas selama penelitian berlangsung.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bai L, Li D, Li J, Luo Z, Yu S, Cao S, Shen L, Zuo Z, Ma X. 2016. Bioactive molecules derived from umbilical cord mesenchymal stem cells. *Acta Histochem.* 118(8):761–769.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 319:243–253.
- Cardoso, Ferrari HF, Garcia AF, Novais JB, Silva-Frade C, Ferrarezi MC, Andrade AL, Gameiro R. 2012. Isolation and characterization of Wharton’s jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol.* 12(1):1. doi:10.1186/1472-6750-12-18.
- Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, Novais JB, Silva-Frade C, Ferrarezi MC, Andrade AL, Gameiro R. 2012. Isolation and characterization of Wharton’s jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol.* 12(1):18. <http://www.doaj.org/doaj?func=openurl&issn=14726750&date=2012&volume=12&issue=1&spage=18&genre=article>.
- Chen Y, Yu B, Xue G, Zhao J, Li RK, Liu Z, Niu B. 2013. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation. *Cell Transplant.* 22(6):1075–1086. doi:10.3727/096368912X657602.
- Cheng SL, Lin CH, Yao CL. 2017. Mesenchymal Stem Cell Administration in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: State of the Science. *Stem Cells Int.* 2017. doi:10.1155/2017/8916570.
- Choi YC, Choi JS, Woo CH, Cho YW. 2014. Stem cell delivery systems inspired by tissue-specific niches. *J Control Release.* 193 June:42–50. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.032.
- Davies JE, Walker JT, Keating A. 2017. Concise Review: Wharton’s Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med.* 6:1620–1630.
- Debbarma P, Mondal, TDebbarma, P., Mondal, T., Manna, C., Kumar, K., Mukherjee, J., Das, B. C., Bag, S., & Das, K. (2020). Post-calving umbilical cord tissue offcut: A potential source for the isolation of bovine mesenchymal stem cells. *Veterinary World,* 13(12) 2772–2779. <https://doi.org/10.14202/VET-WORLD.2020.2772-2779>.
- Dias RP, Pinheiro RR, Andrioli A, Farias AC, Sousa ALM, Azevedo DAA, Araújo JF, Aguiar TDF, Teixeira MFS. 2016. Wharton’s jelly cells from sheep umbilical cord maintained with different culture media are permissive to in vitro infection by Small Ruminant Lentiviruses. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 68(5):1292–1300. doi:10.1590/1678-4162-9008.
- Dueñas F, Becerra V, Cortes Y, Vidal S, Sáenz L, Palomino J, De los Reyes M, Peralta OA. 2014. Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res.* 10:1–13. doi:10.1186/1746-6148-10-154.
- Gogjel T, Bankowski E, Jaworski S. 2003. Proteoglycans of Wharton’s jelly. *Int J Biochem Cell Biol.* 35(10):1461–1469.
- Gugjoo MB. 2022. *Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Medicine.* Gugjoo MB, editor. Kashmir: Spinger Nature Singapore.
- Harrell CR, Jovicic BP, Djonov V, Volarevic V. 2020. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells and their secretome in the treatment of SARS-CoV-2-induced acute respiratory distress syndrome. *Anal Cell Pathol.,* siap terbit.
- Hassan G, Kasem I, Soukkarieh C, Aljamali M. 2017. A simple method to isolate and expand human umbilical cord derived mesenchymal stem cells: Using explant method and umbilical cord blood serum. *Int J Stem Cells.* 10(2):184–192. doi:10.15283/ijsc17028.
- Hendijani F. 2017. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif.* 50(2):1–14. doi:10.1111/cpr.12334.
- Hendijani F, Sadeghi-Aliabadi H, Haghjooy Javanmard S. 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton’s jelly matrix. *Cell Tissue Bank.* 15(4):555–565. doi:10.1007/s10561-014-9425-1.
- Hua J, Gong J, Meng H, Xu B, Yao L, Qian M, He Z, Zou S, Zhou B, Song Z. 2014. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem

- cells from umbilical cord matrix: Proliferation and multilineage differentiation as compared to mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and bone marrow. *Cell Biol Int.* 38(2):198–210. doi:10.1002/cbin.10188.
- Jaccard N, Griffin LD, Keser A, Macown RJ, Super A, Veraitch FS, Szita N. 2014. Automated method for the rapid and precise estimation of adherent cell culture characteristics from phase contrast microscopy images. *Biotechnol Bioeng.* 111(3):504–517. doi:10.1002/bit.25115.
- Joel MDM, Yuan J, Wang J, Yan Y, Qian H, Zhang X, Xu W, Mao F. 2019. MSC: Immunoregulatory effects, roles on neutrophils and evolving clinical potentials. *Am J Transl Res.* 11(6):3890–3904.
- Kusindarta DL, Wihadmadyatami H. 2021. Conditioned medium derived from bovine umbilical mesenchymal stem cells as an alternative source of cell-free therapy. *Vet World.* 14(10):2588–2595. doi:10.14202/VETWORLD.2021.2588-2595.
- Lara E, Rivera N, Rojas D, Rodríguez-Alvarez LL, Castro FO. 2017. Characterization of mesenchymal stem cells in bovine endometrium during follicular phase of oestrous cycle. *Reprod Domest Anim.* 52(5):707–714. doi:10.1111/rda.12969.
- Lu T, Xiong H, Wang K, Wang S, Ma S, Guan W. 2014. Isolation and characterization of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from cattle. *Appl Biochem Biotechnol.* 174(2):719–28.
- Lv FJ, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. 2014. Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 32(6):1408–1419. doi:10.1002/STEM.1681.
- Mançanares CAF, Oliveira VC, Oliveira LJ, Carvalho AF, Sampaio R V, Mançanares ACF, Souza AF, Perecin F, Meirelles F V, Miglino MA, *et al.* 2015. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the yolk sacs of bovine embryos. *Theriogenology.* 84(6):887–898.
- Marcus AJ, Woodbury D. 2008. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard. *J Cell Mol Med.* 12(3):730–742. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00221.x.
- Merlo B, Gugole PM, Iacono E. 2022. An update on applications of cattle mesenchymal stromal cells. *Animals.* 12(15):85–88. doi:10.3390/ani12151956.
- Minin Y V., Shuvalova NS, Deryabina OG, Kucherenko TI, Chaika SP. 2022. Isolation and cultivation of MSC-like population from the rabbit amniotic membrane. *Biopolym Cell.* 38(4):224–230. doi:10.7124/bc.000A83.
- de Moraes CN, Maia L, Dias MC, Dell’Aqua CPF, da Mota LSLS, Chapwanya A, Landim-Alvarenga F da C, Oba E. 2016. Bovine endometrial cells: a source of mesenchymal stem/progenitor cells. *Cell Biol Int.* 40(12):1332–1339. doi:10.1002/cbin.10688.
- Naeem A, Gupta N, Naeem U, Khan MJ, Elrayess MA, Cui W, Albanese C. 2022. A comparison of isolation and culture protocols for human amniotic mesenchymal stem cells. *Cell Cycle.* 21(15):1543–1556. doi:10.1080/15384101.2022.2060641.
- Nogami M, Tsuno H, Koike C, Okabe M, Yoshida T, Seki S, Matsui Y, Kimura T, Nikaido T. 2012. Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. *Transplantation.* 93(12):1221–1228. doi:10.1097/tp.0b013e3182529b76.
- Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring H-J, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, *et al.* 2008. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 26(2):300–311. doi:10.1634/stemcells.2007-0594.
- Pawitan JA, Liem IK, Budiyanti E, Fasha I, Feroniasanti L, Jamaan T, Sumapradja K. 2014. Umbilical cord derived stem cell culture: Multiple-harvest explant method. *Int J PharmTech Res.* 6(4):1202–1208.
- Putra A. 2019. *Basic Molecular Stem Cell.* Volume ke-1. Soebandrio A, Kusnadi Y, editor. Semarang: Unisula Press.
- Raoufi MF, Tajik P, Dehghan MM, Eini F, Barin A. 2011. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. *Reprod Domest Anim.* 46(1):95–99. doi:10.1111/J.1439-0531.2010.01594.X.
- Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, Basalova N, Kalinina N, Akopyan Z, Efimenko A. 2019. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. *Int J Mol Sci.* 20(7):1–16. doi:10.3390/ijms20071656.
- Sampaio R V., Chiaratti MR, Santos DCN, Bressan FF, Sangalli JR, Sá ALA, Silva TVG, Costa NN, Cordeiro MS, Santos SSD, *et al.* 2015. Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: Isolation, characterization, and multipotentiality. *Genet Mol Res.* 14(1):53–62. doi:10.4238/2015.January.15.7.
- Singh J, Mann A, Kumar D, Duhan JS, Yadav PS. 2013. Cultured buffalo umbilical cord matrix cells exhibit characteristics of multipotent mesenchymal stem cells. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 49(6):408–416. doi:10.1007/s11626-013-9617-1.
- Skiles ML, Brown KS, Tatz W, Swingle K, Brown HL. 2018. Quantitative analysis of composite umbilical cord tissue health using a standardized explant approach and an assay of metabolic activity. *Cytotherapy.* 20(4):564–575. doi:10.1016/j.jcyt.2018.01.001.



- Skiles ML, Marzan AJ, Brown KS, Shamonki JM. 2020. Comparison of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells isolated from cryopreserved material and extracted by explantation and digestion methods utilizing a split manufacturing model. *Cytotherapy*. 22(10):581–591. doi:10.1016/j.jcyt.2020.06.002.
- Sumapraja K, Hestiantoro A, Liem IK, Boediono A, Jacob TZ. 2021. Effect of conditioned medium of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a culture medium for human granulosa cells: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*. 19(12):1037–1044. doi:10.18502/ijrm.v19i12.10054
- Sunarto H, Trisnadi S, Putra A, Anna Chalimah Sa N, Tjipta A. 2020. The role of hypoxic mesenchymal stem cells conditioned medium in increasing vascular endothelial growth factors (VEGF) levels and collagen synthesis to accelerate wound healing. *Indones J Cancer Chemoprevent*. 11(3):134–143.
- Varaa N, Azandeh S, Khodabandeh Z, Gharravi AM. 2019. Wharton's Jelly mesenchymal stem cell: Various protocols for isolation and differentiation of hepatocyte-like cells; narrative review. *Iran J Med Sci*. 44(6):437–448. doi:10.30476/ijms.2019.44952.
- Wang F, Fang B, Qiang X, Shao J, Zhou L. 2020. The efficacy of mesenchymal stromal cell-derived therapies for acute respiratory distress syndrome a meta-analysis of preclinical trials. *Respir Res*. 21(307):1–10. doi:10.1186/s12931-020-01574-y.
- Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, Troyer D, McIntosh KR. 2008. Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. *Stem Cells*. 26(11):2865–2874. doi:10.1634/stemcells.2007-1028.
- Xiong H, Bai C, Wu S, Gao Y, Lu T, Hu Q, Guan W, Ma Y. 2014. Biological characterization of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord. *Animal Cells Syst (Seoul)*. 18(1):59–67. doi:10.1080/19768354.2014.880370.
- Xu XL, Yi F, Pan HZ, Duan SL, Ding ZC, Yuan GH, Qu J, Zhang HC, Liu GH. 2013. Progress and prospects in stem cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 34(6):741–746. doi:10.1038/aps.2013.77.
- Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, Kim BJ, Jeon HW. 2013. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int*. 2013. doi:10.1155/2013/428726.
- Zisa D, Shabbir A, Suzuki G, Lee T. 2009. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Biochem Biophys Res Commun*. 390(3):834–838. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.058.Vascular.