

## Tingkat Proliferasi *Primordial Germ Cells* secara *In Vitro* dalam Medium Kultur dengan Penambahan *Leukemia Inhibitory Factor*

(*IN VITRO PROLIFERATION RATE OF MICE  
PRIMORDIAL GERM CELLS IN THE CULTURE MEDIUM  
WITH ADDITION OF LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR*)

Wahono Esthi Prasetyaningtyas<sup>1,2</sup>, Ni Wayan Kurniani Karja<sup>3</sup>,  
Srihadi Agungpriyono<sup>2</sup>, Mokhamad Fahrudin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu-ilmu Faal dan Khasiat Obat,  
Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor,

<sup>2</sup>Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi,

<sup>3</sup>Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor,

Jawa Barat, Indonesia, 16680

\*E mail: [mfahrudin@apps.ipb.ac.id](mailto:mfahrudin@apps.ipb.ac.id)

### ABSTRAK

*Primordial germ cell* (PGC) adalah prekursor bagi pembentukan sel gamet jantan dan betina. Kemampuan PGC yang masih bersifat *totipoten* dapat digunakan sebagai model untuk mempelajari patogenesis penyakit kanker dan kasus infertilitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik fetus mencit sebagai sumber PGC, tingkat proliferasi PGC dan peran *Leukemia Inhibitory Factor* LIF pada kultur PGC. Penelitian ini menggunakan 26 fetus mencit umur 13,5 *day post coital* (dpc) untuk isolasi rigi kelamin sebagai sumber PGC. Disosiasi rigi kelamin menggunakan tripsin 0,1% dan kultur *in vitro* menggunakan medium *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) yang diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup>C dan 5% CO<sub>2</sub>. Fetus diukur dan ditimbang untuk mengetahui perkembangan normal fetus dan dilanjutkan dengan identifikasi rigi kelamin setelah laparotomi yang dilakukan di bawah mikroskop stereo. Tingkat proliferasi diketahui setelah kultur *in vitro* selama enam hari dengan menghitung *Population Doubling Time* (PDT) serta viabilitas sel. Efek penambahan LIF 1000 IU/L terhadap tingkat proliferasi PGC dievaluasi dari dua jenis perlakuan medium (DMEM), yaitu 1) DMEM yang ditambah *fetal calf serum* (FCS) 15% (DMEM + S15%) dan 2) DMEM yang ditambah FCS 15% dan LIF 1000 IU/ml (DMEM + S15% + LIF 1000 IU/ml). Pewarnaan imunohistokimia (IHK) dilakukan pada hari ke-3, ke-6 dan ke-9 kultur untuk mengamati ekspresi Oct-4 pada PGC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fetus sebagai sumber PGC memiliki perkembangan yang normal dengan ukuran fetus berkisar 11 mm, serta rigi kelamin jantan dan betina bisa dibedakan berdasarkan morfologinya pada umur 13,5 dpc. Proliferasi PGC relatif lambat dengan nilai PDT 1,3 hari dengan viabilitas sekitar 85%. Kultur PGC dengan perlakuan DMEM + S15%, menunjukkan penurunan persentase PGC yang mengekspresikan Oct-4 mulai hari ke-3 sedangkan pada perlakuan DMEM + S15% + LIF 1000 IU/mL terjadi peningkatan persentase PGC yang mengekspresikan Oct-4 pada hari ke-6 tetapi turun kembali pada hari ke-9. Dapat disimpulkan bahwa penambahan LIF mampu mempertahankan jumlah PGC sampai hari ke-6 kultur. Senyawa LIF berperan dalam regulasi proliferasi PGC melalui reseptor LIF (*RLIF*) dan reseptor glikoprotein (gp) 130.

Kata-kata kunci: LIF; morfologi; Oct 4; *primordial germ cell*; rigi kelamin

### ABSTRACT

Primordial germ cells (PGCs) are precursors for gamete cells. The totipotency of PGCs allows them to be used as a model for studying cancer and infertility. The study aimed to examine the characteristics of the mice fetus as a source of PGCs, proliferation rate of PGC and the role of LIF in vitro culture of PGCs.

This study used genital ridges from 26 fetuses at 13.5 days post-coital (dpc) to isolate the PGCs. Genital ridges dissociation using 0.1% of trypsin and *in vitro* culture was carried out using the Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The fetus was measured and weighed to determine the normal development of the fetus and continued with the identification of the genital ridges after laparotomy performed under a stereomicroscope. Proliferation rate was measured by calculating Population Doubling Time (PDT), and cell viability was observed after *in vitro* culture for six days. The effect of adding 1000 IU/ml of leukemia inhibitory factor (LIF) was evaluated from two types of treatment in the medium, 1) DMEM added with 15% of fetal calf serum (FCS) (DMEM + S15%) and 2), DMEM was supplemented with 15% of FCS and 1000 IU/ml LIF (DMEM + S15% + LIF1000 IU/ml). Immunohistochemistry staining was carried out on the third-, sixth- and ninth-day of culture to detect the expression of Oct-4 in the PGCs, then cells were counted. The results showed that the fetus as a source of PGCs had normal development. The fetal sizes were 11 mm, and male and female genital ridges could be distinguished by morphology at the age of 13.5 dpc. The proliferation of PGCs was relatively slow with a 1.3 day PDT value with the viability of around 85%. Culture of PGCs with DMEM + S15% treatment showed the percentage of PGCs that expressing Oct-4 decreased from the third day of culture to the ninth day of culture. The culture of PGCs in DMEM + S15% + LIF 1000 IU / ml treatment showed that the percentage of PGCs that expressed Oct 4 increased on the sixth day of culture and decreased on the ninth day of culture. It can be concluded that the addition of LIF can maintain the number of PGCs until the sixth day of culture. LIF is thought to play a role in the regulation of proliferation of PGCs through receptors of LIF (RLIF) and glycoprotein (gp) 130 receptors.

Keywords: LIF; morphology; Oct 4; primordial germ cell; genital ridges

## PENDAHULUAN

Sel gamet jantan dan betina berasal dari *Primordial Germ Cells* (PGC) atau benih sel germinal. *Primordial Germ Cells* merupakan prekursor dari sel gamet jantan dan betina yang masih bersifat *totipoten* (Ohinata *et al.*, 2009; Ledda *et al.*, 2010; Donovan, 2011; Saitou dan Yamaji, 2012; Nikolic *et al.*, 2016). *Totipoten* adalah kemampuan sel untuk berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel. Oleh karena masih bersifat *totipoten*, PGC mempunyai beberapa kesamaan dengan *embryonic stem cells*, antara lain kesamaan morfologi dan perkembangan sel serta kesamaan genetik (Schuh-Huerta dan Pera, 2011) sehingga PGC berpotensi digunakan sebagai bahan terapi pada berbagai penyakit degeneratif (Shamblott *et al.*, 1998). Beberapa penelitian tentang penggunaan PGC telah dilaporkan, antara lain PGC sebagai sumber pembentukan sel darah secara *in vitro* pada unggas (Rich, 1995) dan pemanfaatan PGC untuk konservasi dan produksi unggas transgenik (Intarapat dan Stern, 2013). Potensi PGC besar namun belum banyak penelitian yang mengeksplorasi kemampuan PGC tersebut.

*Primordial Germ Cells* berasal dari lapis epiblas yang pada awal perkembangannya mengalami migrasi ke genital ridge rigi kelamin (Soto-Suazo dan Zorn, 2005). Selama migrasi, sel ini mengalami proliferasi sehingga populasinya menjadi dua kali lipat, yang dikenal dengan *Population Doubling Time* (PDT). Proses ini memerlukan waktu kira-kira 16 jam dari

umur 8,5-13,5 dpc, dan pada 13,5 dpc populasi PGC pada rigi kelamin mencapai 24 000 sel (Nikolic *et al.*, 2016). Setelah sampai di rigi kelamin pada 13,5 dpc, PGC jantan memasuki fase istirahat (*mitotic arrest*) sedangkan PGC betina memasuki tahap meiosis, selanjutnya PGC berdiferensiasi menjadi gamet jantan dan betina (Ohinata *et al.*, 2009; Saitou dan Yamaji, 2012; Nikolic *et al.*, 2016).

Observasi pertumbuhan PGC pada medium kultur *in vitro* digunakan untuk mempelajari faktor-faktor yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi PGC serta yang berhubungan dengan kasus klinik. Keterbatasan jumlah PGC pada rigi kelamin memerlukan metode untuk memperbanyak PGC tersebut yang dilakukan dalam medium kultur *in vitro*. Namun, PGC di dalam kultur seringkali mengalami diferensiasi, sehingga diperlukan metode kultur yang tepat agar sel mampu berproliferasi tetapi tidak berdiferensiasi untuk mempertahankan sifat totipoten (Ledda *et al.*, 2010). Oleh karena itu penggunaan medium yang tepat dalam kultur mampu mempertahankan sifat totipoten tersebut. Untuk mempertahankan sifat totipoten, kultur PGC umumnya menggunakan *feeder layer* dan menambahkan serum/*Fetal Calf Serum* (FCS) dengan konsentrasi 15%, namun keberadaan serum pada medium bisa menyebabkan PGC berdiferensiasi secara spontan. Pada kultur PGC dengan menggunakan *feeder layer* selama dua hari, penambahan *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) 1000 IU/mL pada hari pertama kultur mampu

mempertahankan PGC untuk tidak berdiferensiasi dan menurun pada hari ke dua (Cheng *et al.*, 1994). Penggunaan *feeder layer* umum digunakan pada kultur PGC, penelitian ini tidak menggunakan *feeder layer* namun hanya menggunakan matriks ekstraseluler gelatin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik fetus sebagai sumber PGC, tingkat proliferasi PGC dan peran LIF pada medium kultur PGC tanpa menggunakan *feeder layer*.

## METODE PENELITIAN

### Hewan Penelitian

*Primordial germ cells* diperoleh dari 26 fetus mencit umur  $\pm 13,5$  dpc. Mencit sebagai sumber PGC didapatkan dengan cara mengawinkan mencit dengan perbandingan 1:1 tanpa stimulasi hormon. Keesokan harinya dilakukan pengamatan pada vagina mencit, bila terdapat *vaginal plug* dianggap sebagai H1 *post coitus*. Mencit dipelihara di Unit Pengelola Hewan Laboratorium FKH IPB dengan pemberian ransum standar dan minum secara *ad libitum*. Pada saat isolasi PGC, mencit bunting dikorbankan nyawanya dengan cara *cervical dislocation*. Kelayakan penggunaan hewan untuk penelitian telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan IPB dengan sertifikat persetujuan etik hewan nomor 089/KEH/SKE/III/2018.

### Karakteristik Fetus dan Isolasi Rigi Kelamin Sumber PGC

Isolasi PGC dari rigi kelamin menggunakan metode yang dikembangkan oleh Moreno-Ortiz *et al.* (2009). Fetus dikeluarkan dari uterus dengan cara laparotomi, kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9%. Sebelum diisolasi fetus ditimbang kemudian diukur dengan jangka sorong. Penimbangan dan pengukuran tubuh fetus pada penelitian bertujuan untuk menentukan kondisi perkembangan fetus yang normal. Selanjutnya dilakukan pemisahan kepala fetus dari abdomen menggunakan skalpel. Usus dan hati dikeluarkan dari rongga abdomen sehingga sistem urogenitalis terlihat jelas menggunakan mikroskop stereo (Olympus SZX7. Japan). Rigi kelamin ditemukan menempel pada duktus mesonefros yang berada di sekitar ginjal. Rigi kelamin diisolasi berikut jaringan di sekitarnya menggunakan pinset dan *syringe* 26 G, kemudian dipindahkan ke dalam

cawan petri berisi *Dulbecco Phosphate Buffer Saline* (DPBS Lonza 17-512F). Rigi kelamin selanjutnya dipisahkan dari duktus mesonefros dan jaringan lain.

Rigi kelamin dipotong kecil kemudian dicuci sebanyak empat kali menggunakan DPBS, yang ditambah dengan Gentamycin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Merck). Setelah pencucian, rigi kelamin ditripsinasi dengan menggunakan 0,1% tripsin (Biosciences 59418C) dalam DPBS selama 10 menit pada suhu 37°C. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 g selama satu menit untuk mendapatkan pelet sel. Pelet kemudian diencerkan dengan larutan DPBS 1 mL yang mengandung *Fetal Calf Serum* (FCS, Sigma) 10% dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa enzim tripsin. Larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 xg selama satu menit.

### Tingkat Proliferasi PGC pada Kultur *In Vitro*

Tingkat proliferasi sel dievaluasi pada hari ke-6 kultur dengan menghitung *population doubling time* (PDT) (Roth 2006) dan persentase viabilitas (Strober, 2001), penghitungan sel menggunakan hemositometer Neubauer. Pada hari ke-6 kultur, sel didisosiasi dengan enzim tripsin 0,1% dalam DPBS pada suhu 37 °C selama 10 menit. Selama disosiasi, pemipetan berulang dilakukan untuk mempercepat proses pemisahan sel. Sel yang telah terdisosiasi sempurna selanjutnya disentrifugasi selama tiga menit dengan kecepatan 3000 xg, supernatan dibuang untuk mendapatkan pelet sel kemudian dihitung konsentrasi dan persentase viabilitasnya.

### Pertumbuhan PGC dalam Medium yang Ditambah dengan LIF

Isolasi PGC dilakukan sesuai metode sebelumnya, kemudian PGC dikultur dalam media DMEM + 15% serum dengan 1000 IU/mL LIF (DMEM+ 15%+LIF) dan tanpa LIF (DMEM+15%) (LIF, Sigma). Kultur dilakukan di dalam inkubator pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama sembilan hari dan medium diganti setiap tiga hari sekali. Identifikasi PGC dilakukan pada hari ke-3, ke-6 dan ke-9 dengan pewarnaan imunohistokimia (IHK kit AB64261) menggunakan antibodi anti-Oct 4 (AB 59545) (Protokol Abcam).

Proses fiksasi PGC dilakukan dengan merendam PGC dalam larutan methanol 100% pada suhu -20°C selama satu jam, kemudian

dipermeabilisasi menggunakan 0,1% triton x 100 (Merck) selama 10 menit pada suhu kamar. Reaksi antigen dan antibodi divisualisasi menggunakan *diaminobenzidine* (DAB) dan dilakukan *counterstain* menggunakan hematoksin. Setelah dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS), sel diamati dan dihitung di bawah mikroskop inverted (Olympus IX70, Japan).

### Analisis Data

Data karakteristik fetus dan tingkat proliferasi ditampilkan dengan nilai rata-rata. Data tingkat proliferasi dianalisis menggunakan uji sidik ragam pada taraf signifikan 0,05%, dan uji beda lanjut dengan menggunakan uji Duncan. Data jumlah PGC dengan pewarnaan IHK disajikan secara deskriptif. Pengolahan data menggunakan program R version 3.5.1 tahun 2018.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Fetus dan Isolasi Rigi Kelamin Sumber PGC

Perkembangan fetus secara normal dapat diketahui dari ukuran dan berat fetus. *Primordial Germ Cells* yang digunakan dalam penelitian adalah sel yang sudah mencapai rigi kelamin pada umur fetus 13,5 dpc. Sebelum mencapai rigi kelamin, PGC mengalami migrasi

sehingga apabila waktunya kurang tepat akan menyulitkan pada saat isolasi PGC. Fetus pada umur fetus 13,5 dpc dengan perkembangan yang tidak normal memiliki ukuran di bawah rata-rata dan rigi kelamin tidak terlihat sehingga isolasi PGC sulit dilakukan. Fetus umur 13,5 dpc yang digunakan untuk isolasi PGC memiliki karakteristik seperti yang tercantum pada Tabel 1. Fetus umur 13,5 dpc memiliki panjang  $\pm 11$  mm sedangkan menurut Moreno-Ortiz *et al.*, (2009), fetus dengan umur yang sama memiliki panjang berkisar 16 mm. Variasi perkembangan dan ukuran fetus selama kebuntingan dipengaruhi oleh embrio maupun plasenta serta lingkungan uteri atau interaksi fetomaternal. Selain itu jumlah anak dalam satu kebuntingan, ras dan nutrisi mencit juga memengaruhi ukuran fetus (Ishikawa *et al.*, 2006).

Posisi rigi kelamin jantan dan betina berbeda, posisi rigi kelamin jantan berada di dekat kantung kemih sedangkan rigi kelamin betina berada di sebelah kaudolateral dari ginjal (Moreno-Ortiz *et al.*, 2009). Pada saat proses isolasi, posisi organ urogenital kerap sudah tidak beraturan pada saat pemisahan saluran pencernaan dan hati, menyebabkan posisi tidak bisa dijadikan sebagai acuan untuk identifikasi rigi kelamin. Identifikasi lebih mudah dilakukan dengan melihat perbedaan morfologi rigi kelamin, karena PGC setelah berada di rigi kelamin bisa dibedakan antara PGC jantan dan

Tabel 1. Karakteristik fetus sumber *primordial germ cells* (PGC)

Ulangan	Bobot fetus dan plasenta (mg)	Ukuran fetus (mm)		Jenis kelamin	
		Panjang	Lebar	Jantan	Betina
Induk 1	372	10,3	9,8	4	8
Induk 2	352	11,6	9,6	5	6
Induk 3	402	11,2	7,9	4	7
Rataan $\pm$ STD	371 $\pm$ 32,02	11 $\pm$ 0,511	9 $\pm$ 1,07	5 $\pm$ 1,73	7 $\pm$ 1,53

Tabel 2. Perkembangan *primordial germ cells* (PGC) mencit dalam kultur

Waktu	Konsentrasi (sel/mL)	Viabilitas (%)
Hari ke-0	3,2 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	87,0 % <sup>a</sup>
Hari ke-6	7,64 x 10 <sup>5</sup> <sup>b</sup>	89,4 % <sup>a</sup>
PDT	1,3 hari	

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata, sedangkan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). PDT : *population doubling time*

betina (Hogan *et al.*, 1994). Morfologi rigi kelamin jantan terlihat seperti bergaris karena bentuk tali testis (tubulus) yang memanjang, sedangkan rigi kelamin betina seperti titik-titik yang tersebar merata di rigi kelamin karena sel telur dan sel folikel belum membentuk folikel seperti pada ovarium dewasa (Gambar 1). Berdasarkan morfologinya, rigi kelamin jantan lebih mudah diidentifikasi dibanding rigi kelamin betina. Pada saat melakukan identifikasi rigi kelamin perlu kehati-hatian karena rigi kelamin memiliki kemiripan dengan ginjal, namun struktur ginjal lebih besar.

**Tingkat Proliferasi PGC pada Kultur *In Vitro***

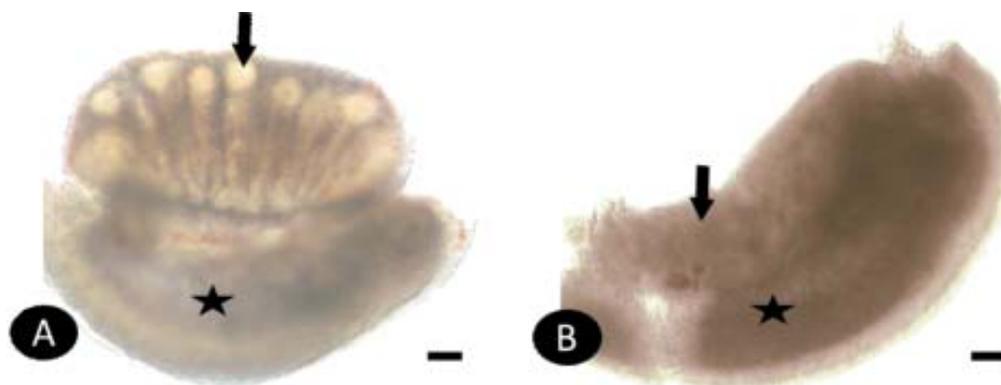
Jumlah PGC di rigi kelamin secara *in vivo* sangatlah terbatas. Menurut Nikolic *et al.* (2016) jumlah PGC sekitar 24 000 pada hari ke 13,5 dpc. Untuk pemanfaatan PGC selanjutnya diperlukan upaya perbanyak PGC secara *in vitro*, dengan metode kultur yang baik. Jumlah PGC yang terbatas dan sel stroma yang sedikit (Cheng *et al.*, 1994), mengakibatkan pertumbuhan sel ini lambat. Proliferasi PGC yang lambat terlihat dari konsentrasi  $3,2 \times 10^4$  pada hari ke-0, menjadi  $7,64 \times 10^5$  setelah kultur selama enam hari dengan nilai PDT adalah 1,3 hari. Viabilitas PGC tidak berbeda nyata dari sebelum dan setelah dikultur yaitu di atas 85%.

Proliferasi PGC pada kultur *in vitro* memerlukan *growth factor*, penelitian ini menggunakan FCS dengan konsentrasi 15% karena serum mengandung banyak faktor pertumbuhan yang mendukung pertumbuhan sel. Maurer (1987) menyatakan, fungsi serum adalah: 1) faktor hormonal yang menstimulasi pertumbuhan dan fungsi sel, 2) faktor

perlekatan (*attachment*) dan biomatriks, dan 3) transpor protein yang membawa hormon, mineral, dan lipid. Selain penambahan serum, penggunaan *feeder layer* juga berperan dalam proliferasi PGC (Moreno-Ortiz *et al.* (2009). *Feeder layer* tidak digunakan pada penelitian ini, sebagai penggantinya digunakan gelatin dengan konsentrasi 1% sebagai matriks ekstraseluler untuk memudahkan sel menempel dan berproliferasi (Maurer, 1987).

**Pertumbuhan PGC dalam Medium yang Ditambah dengan LIF**

Hasil penelitian menunjukkan perkembangan PGC secara *in vitro* berjalan lambat, hal ini diduga disebabkan oleh jumlah PGC serta keberadaan sel stroma yang sedikit sehingga aktivitas komunikasi antar sel kurang optimal. Optimasi proliferasi PGC dibutuhkan media yang kaya akan nutrisi. Moreno-Ortiz *et al.* (2009) menggunakan *feeder layer* pada saat kultur PGC untuk menginduksi perkembangan dan mencegah diferensiasi. *Feeder layer* dapat digantikan oleh sel stroma, sel ini sebagai penunjang yang mensekresikan *growth factor* seperti *cytokines* yang berperan dalam menjaga sifat *pluripoten* sel (Yang *et al.*, 2016). Selain menggunakan *feeder layer*, penambahan LIF dan *retinoic acid* (RA) juga dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel PGC (Makoolati *et al.*, 2016). Perbanyak PGC membutuhkan media atau *growth factor* yang mendukung proliferasi dan mencegah diferensiasi sel. Penambahan LIF 1000 IU/mL dalam medium kultur selama dua hari kultur dapat menyebabkan kenaikan jumlah PGC pada hari pertama dan menurun pada hari ke dua (Cheng *et al.*, 1994).



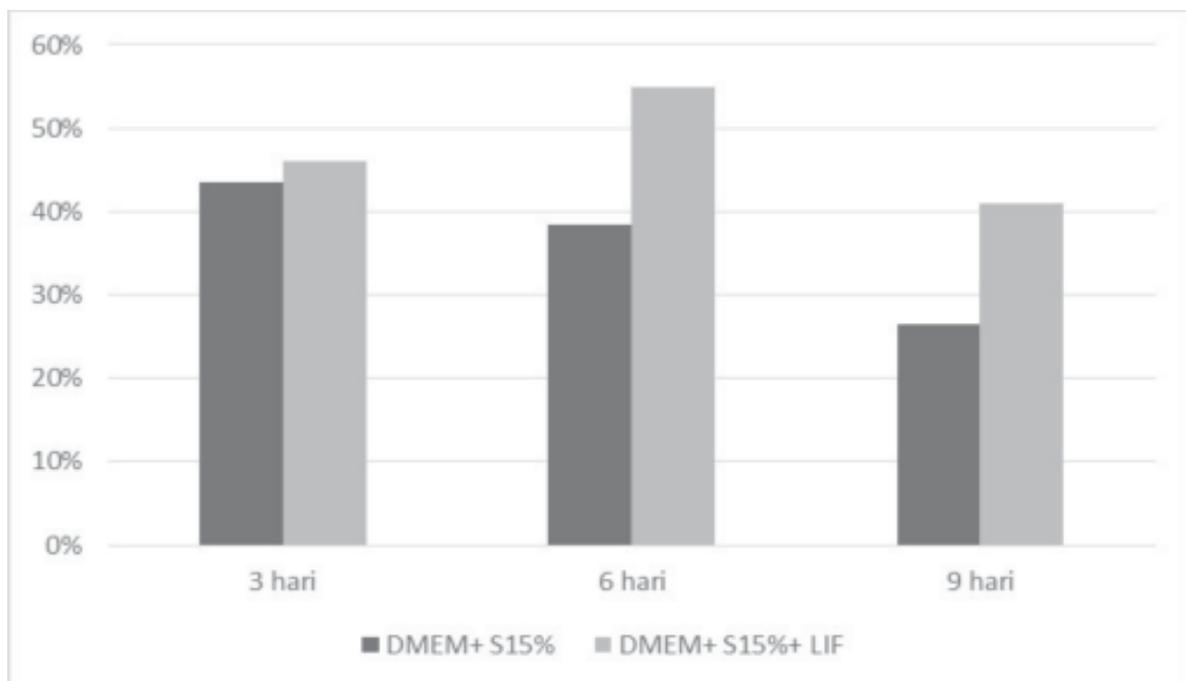
Gambar 1. Morfologi rigi kelamin dari fetus umur 13,5 dpc sebagai lokasi PGC. Rigi kelamin dengan PGC jantan (A) dan rigi kelamin dengan PGC betina (B) setelah dikeluarkan dari rongga abdomen. Mesonephros (★), rigi kelamin (↔). Bar = 100 µm.

Pengamatan PGC yang masih bersifat totipoten digunakan pewarnaan IHK dengan menggunakan anti-Oct-4. Ekspresi Oct-4 teramati pada sel-sel yang memiliki sifat totipoten maupun pluripoten, dan positif pada *embryonic stem cell* maupun sel germinal (Pesce dan Schöle, 2000). Penggunaan anti-Oct-4 digunakan untuk melihat sifat totipotensi, dan pewarnaan yang spesifik terhadap PGC dapat menggunakan antibodi yang mendeteksi gen *deleted in azoospermia-like* (DAZL) maupun gen *Vasa* yang terekspresi pada sel kelamin pre dan postnatal (Nikolic *et al.*, 2016). Pada penelitian ini, rataan persentase PGC yang mengekspresikan Oct-4 pada kultur PGC selama sembilan hari tanpa penambahan LIF menunjukkan nilai yang menurun mulai hari ke-3 sampai hari ke-9. Penambahan LIF sebanyak 1000 IU/mL pada medium kultur PGC selama sembilan hari menunjukkan rataan persentase PGC yang mengekspresikan Oct-4 mengalami peningkatan pada hari ke-6 dan menurun pada hari ke-9 (Gambar 2).

Keberadaan serum dalam medium tanpa LIF dapat menginduksi PGC untuk berdiferensiasi menjadi sel lain (Moreno-Ortiz *et al.*, 2009), sehingga jumlah PGC-semakin menurun pada hari ke-9. Medium kultur

alternatif selain serum adalah menggunakan medium *knockout*, yaitu medium yang mengandung faktor pertumbuhan spesifik yang bertujuan untuk meningkatkan proliferasi sel. Penambahan LIF dalam medium kultur berperan dalam menginduksi PGC agar bertahan hidup (*survive*) dan berproliferasi dalam medium kultur (Cheng *et al.*, 1994) walaupun PGC dikultur tanpa menggunakan *feeder layer*, serta mencegah sel berdiferensiasi (Wang *et al.*, 2015). *Leukemia Inhibitory Factor* dapat berperan sebagai *co-mitogen* yang berfungsi sebagai *growth factor*, dan juga berperan dalam menekan proses apoptosis PGC di dalam kultur (Pesce *et al.* 1993). Pada kondisi kultur *in vitro* keberadaan reseptor LIF di PGC sangat signifikan menunjang kemampuan *survival* PGC (Cheng *et al.*, 1994).

*Leukimia inhibiting factor* berperan melalui reseptor LIF (*LIFR*) dan gp 130, yang mengirimkan sinyal untuk *survive* bersamaan dengan sinyal dari C-Kit reseptor sehingga meregulasi proliferasi PGC (Donovan, 2011). Salah satu dari molekul *signaling* yang teraktivasi oleh sinyal LIF yang berperan sebagai sinyal *transducer* dan *activator* adalah *transcription-3* (*Stat3*) yang dapat meregulasi gen *cyclins*-Masterregulator of cell cycle antry



Gambar 2. Persentase jumlah *primordial germ cells* (PGC) yang terdeteksi dengan menggunakan pewarnaan immunohistokimia Oct-4 dari hari ke-3, 6 dan ke-9 pada dua jenis medium yang berbeda.

(*c-Myc*). Gen *c-Myc* adalah gen yang meregulasi proliferasi sel dan sangat berperan pada tahap perkembangan (Dang, 1999). Aktivasi gen ini menyebabkan sel mengekspresikan protein Oct-4, Sox 2 dan Nanog yang merupakan *marker* sel yang bersifat pluripoten.

### SIMPULAN

Fetus umur 13,5 dpc dengan ukuran 11 mm menunjukkan perkembangan yang normal sehingga memudahkan identifikasi PGC. Tingkat proliferasi PGC dalam medium kultur selama enam hari memiliki nilai PDT 1,3 hari. Perkembangan PGC secara *in vitro* diharapkan mampu menjaga konsentrasi PGC yang pluripoten, namun penambahan medium 15% dapat memicu proses diferensiasi. Penambahan LIF 1000 IU/mL dalam medium kultur mampu mempertahankan persentase PGC dengan lama kultur selama enam hari.

### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan penanda-penanda (*markers*) yang spesifik untuk PGC seperti DAZL dan VASA.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada Kementerian Keuangan Republik Indonesia melalui LPDP yang telah memberikan beasiswa BUDI DN dan dana penelitian. Terimakasih juga kami sampaikan kepada Bapak Wahyudin (Lab Embriologi FKH IPB) sebagai Laboran yang membantu jalannya penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Cheng L, Gearing DP, White LS, Compton DL, Schooley K, Donovan PJ, 1004. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Development* 120: 3145-3153.
- Dang CV. 1999. *c-Myc* Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Mol Cell Biol* 19(1): 1-11.
- Donovan PJ. 2011. Pathways to Pluripotency: How Germ Cells Make Stem Cells. Dalam: Orwig KE, Hermann BP (Eds). *Male Germline Stem Cells: Developmental and Regenerative Potential*. USA: Humana Press. Hlm. 3-24.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo a laboratory manual*. Ed ke-2. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hlm. 166-168.
- Intarapat S, Stern CD. 2013. Chick stem cells: Current progress and future prospects. *Stem Cell Res* 11: 1378-1392. doi:10.1016/j.scr.2013.09.005.
- Ishikawa H, Seki R, Yokonishi S, Yamauchi T, Yokohama K. 2006. Relationship between fetal weight, placental growth and litter size in mice from mid-to late-gestation. *Reprod Toxic* 21: 267-270. doi:10.1016/j.reprotox.2005.08.002.
- Kee K, Gonsavales JM, Clark AT, Pera RAR. 2006. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 15(6): 831-837. doi:10.1089/scd.2006.15.831.
- Ledda S, Bogliolo L, Bebbere D, Ariu F, Pirino S. 2010. Characterisation, isolation and culture of primordial germ cell in domestic animals: recent progress and insights from ovine species. *Theriogenology* 74: 534-543. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.05.011.
- Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. 2016. Proliferation in culture of primordial germ cells derived from embryonic stem cells: induction by retinoic acid. *Biosci Rep* 36:e00428. doi: 10.1042/BSR20160441.
- Maurer HR. 1987. Toward chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. Dalam: Freshney RI. (Ed). *Animal Cell Culture a practical approach*. Washington, DC: IRL Press. Hlm. 13-31.
- Moreno-Ortiz H, Esteban-Perez C, Badran W, Kent-First M. 2009. Isolation and derivation of mouse embryonic germ cells. *Jove* 32. doi:10.3791/1635.
- Nikolic A, Volarevic V, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. 2016. Primordial germ cells: current knowledge and perspective. *Stem Cells Int*. ID 1741072. doi:10.1155/2016/1741072.

- Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. 2009. A signalling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 137: 571–584. doi:10.1016/j.cell.2009.03.014.
- Pesce M, Farrace MG, Piacentini M., Dolci S, De FM. 1993. Stem cell factor and leukaemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 118: 1089-1094.
- Pesce M, Schöler HR. 2000. Oct-4: Control of Totipotency and Germline Determination. *Mol Reprod Dev* 55: 452-457.
- Rich IN. 1995. Primordial germ cells are capable of producing cells of the hematopoietic system in vitro. *Blood* 86(2): 463-472.
- Roth V. 2006. Doubling time computing. <http://www.doubling-time.com/compute.php>. [diunduh, 7 February 2017].
- Saitou M, Yamaji M. 2012. Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a008375. doi:10.2202/cshperspect.a008375.
- Schuh-Huerta SM, Pera RAR. 2011. Making Germ Cells from Human Embryonic Stem Cells. Dalam: Orwig KE, Hermann BP (Eds). *Male Germline Stem Cells: Developmental and Regenerative Potential*. USA: Humana Press. Hlm. 49-79.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Geehart JD. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci* 95(23): 13726-13731.
- Soto-Suazo M, Zorn TM. 2005. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Anim Reprod* 2(3): 147-160.
- Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>.
- Wang X, Chen T, Zhang Y, Li B, Xu Q, Song C. 2015. Isolation and culture of pig spermatogonial stem cells and their in vitro differentiation into neuron-like cells and adipocytes. *Int J Mol Sci* 16: 26333-26346. doi:10.3390/ijms.161125958.
- Yang HY, Qiu Y, Zheng X, Ding Y, Zeng J, Lu K, Li D. 2016. Effect of a feeder layer composed of mouse embryonic and human foreskin fibroblasts on the proliferation of human embryonic stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* 11: 2321-2328. doi: 10.3892/etm.2016.3204.