



Kultur *Embryonic Stem Cell* menjadi Sel Neuron dengan Medium Bebas Serum

Riris L. Puspitasari, Caroline T. Sardjono, Boenjamin Setiawan, Ferry Sandra

Stem Cell Division, Stem Cell and Cancer Institute,
PT Kalbe Farma Tbk, Jl. Jend. Ahmad Yani No.2, Pulo Mas, Jakarta 13210, Indonesia

ABSTRAK

Stem cell memiliki peran yang besar dalam terapi berbagai penyakit degeneratif. *Stem cell* dapat diperoleh dari beberapa sumber antara lain *adult stem cell* (ASC), *embryonic germinal stem cell* (EGC), dan *embryonic stem cell* (ESC). Dalam artikel berikut akan didiskusikan teknik kultur *embryonic stem cell*, khususnya mengenai teknik pengarahannya menjadi sel neuron. Kultur dengan tujuan mengarahkan menjadi sel neuron dapat dicapai dengan menggunakan *growth factor*, sedangkan medium bebas serum digunakan dengan tujuan untuk meminimalkan pemakaian bahan-bahan dari hewan.

PENDAHULUAN

Saat ini penggunaan teknik kultur sel sudah demikian luasnya dalam dunia biologi maupun medis. Secara fundamental, tujuan para peneliti dan pekerja dalam bidang kultur sel adalah mempersiapkan sel untuk dikultur lebih lanjut dan juga untuk memeliharanya dalam sistem yang bebas kontaminasi walaupun dilakukan pasase (subkultur) berulang-ulang sesuai keperluan.

Makin berkembangnya bidang bioteknologi menyebabkan kegiatan kultur sel menjadi ikut meluas. Berbagai metode baru telah dikembangkan sejalan dengan kebutuhan yang makin kompleks. Beberapa bidang ilmu yang menggunakan kultur sel antara lain biologi seluler, imunologi, farmakologi, biokimia, virologi, genetika, dan produksi berbagai bahan biologis.

Teknik kultur sel dan kultur jaringan memungkinkan kita mempelajari perilaku sel secara *in vitro*. Kondisi lingkungan normal disimulasikan dalam suatu media tumbuh yang mengandung bahan kimia, faktor pertumbuhan, dan komponen serum. Sel-sel yang akan ditumbuhkan dapat dikoleksi dari jaringan baik secara enzimatis maupun mekanis, disuspensikan dan diisolasi dalam media kultur. Sel normal secara genetis mempunyai masa hidup yang terbatas, namun sel-sel yang mengalami transformasi seperti yang dijumpai pada sel tumor atau kanker dapat menjadi sel yang dapat tumbuh dan berkembang (membelah atau memperbanyak diri) tanpa terkontrol serta mempunyai masa hidup yang lebih lama ⁽¹⁾.

Pada kultur sel atau jaringan diusahakan sel dapat berproliferasi dan berdiferensiasi. Proses proliferasi menyangkut pertumbuhan sel sehingga pemahaman mengenai siklus pertumbuhan dan faktor yang berperan dalam proses pertumbuhan sangat diperlukan. Proses diferensiasi sel berhubungan dengan interaksi dan komunikasi sel, sehingga dibutuhkan pemahaman sifat-sifat sel ⁽¹⁾.

Teknik kultur yang pertama kali dilakukan berasal dari potongan jaringan yang ditumbuhkan di atas substrat, sehingga pertumbuhan hanya terbatas pada sel-sel yang bermigrasi dari potongan jaringan tersebut. Beberapa eksplan yang digunakan dalam kultur antara lain sel, jaringan, organ, *cell line*. Dewasa ini banyak penelitian yang mengkultur *stem cell* untuk mendapatkan sel-sel yang dapat diarahkan diferensiasinya ^(2,3).

Embryonic Stem Cell

Stem cell adalah sel-sel yang belum berdiferensiasi, dapat berproliferasi, dan dapat diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel dengan fungsi khusus. Penelitian di bidang medis banyak memfokuskan aplikasi *stem cell* untuk penyakit degeneratif. Kepentingan tersebut didasarkan untuk menemukan sumber jaringan baru sebagai usaha untuk memperbaiki jaringan atau organ manusia yang rusak. Beberapa penyakit yang telah dilaporkan dapat diterapi menggunakan *stem cell* pada mencit dan hewan laboratorium lainnya antara lain Parkinson, hati, diabetes, *spinal cord injury*, jantung, dan Alzheimer ⁽⁴⁾. *Embryonic stem cell* berasal dari embrio yang berada dalam stadium blastosis. Di dalam blastosis terdapat beberapa sel yang letaknya mengumpul di satu sisi. Sel-sel tersebut dinamakan *inner cell mass* (ICM). ICM memiliki beberapa sifat antara lain mampu melakukan pembelahan untuk proliferasi dan kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel lain (*pluripotent*) ⁽⁵⁻¹⁰⁾.

Pada upaya peningkatan fungsional transplantasi ESC untuk penyakit degeneratif perlu diidentifikasi dan diminimalkan risiko yang mungkin timbul. Risiko tersebut antara lain pembentukan tumor dan penolakan jaringan. *Stem cell* memiliki imunitas rendah, ditunjukkan dengan rendahnya ekspresi molekul *human leukocyte antigen* (HLA); HLA akan dapat mengatasi permasalahan reaksi jaringan. Beberapa pendekatan untuk mengurangi atau mengeliminasi penolakan imunologis terhadap ESC antara lain mengurangi



reaktivitas *host* terhadap transplan, mengeliminasi gen-gen yang bertanggung jawab pada reaksi penolakan misalnya pada *major histocompatibility complex* (MHC) kelas I agar cocok untuk semua pasien. Cara lainnya adalah dengan manipulasi genetik menggunakan kloning terapeutik dan penggunaan ESC yang berasal dari hasil partenogenesis^(4,11).

Kultur Pengarahan ESC menjadi Sel Neuron

Propagasi ESC untuk dapat berdiferensiasi menjadi sel tipe tertentu dipengaruhi oleh beberapa faktor yang diregulasi oleh mediator pertumbuhan yang sesuai. Hal tersebut dapat ditunjukkan pada propagasi ESC mencit yang dapat dilakukan melalui kokultur dengan fibroblas embrio atau penambahan LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), yang berlangsung melalui kompleks LIF-R/gp130 (LIF-reseptor; glikoprotein 130)^(12,13). Selain itu, penggunaan kombinasi BMP (*bone morphogenetic protein*) dan LIF dapat mendukung propagasi ESC, yang dikultur tanpa *feeder layer* ataupun serum⁽¹⁴⁾.

Pada propagasi ESC dikenal istilah terbentuknya *embryoid body* (EB). EB merupakan sekumpulan atau agregat sel yang pertumbuhannya dapat mengarah pada sel-sel ektodermal, endodermal, dan mesodermal. Salah satu metode untuk mengarahkan ESC menjadi tipe sel tertentu adalah dengan mengarahkan EB menjadi sel progenitor neuron dalam medium tanpa serum. Medium tanpa serum diharapkan sebagai medium yang selektif terhadap sel prekursor neuron⁽¹⁵⁾. Metode lain yang juga dapat digunakan untuk pengarahan EB menjadi sel neurogenik adalah dengan penambahan zat penginduksi seperti FGF2 (*fibroblast growth factor*)^(15,18); FGF⁽¹⁶⁾; BMP2, RA (*retinoic acid*), Shh (*sonic hedgehog*), Wnt3a^(17,20); BMP4⁽¹⁵⁾; CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) dan neurotrofin 3⁽¹⁹⁾. Zat penginduksi tersebut ditambahkan ke dalam medium baik secara tunggal maupun kombinasi.

Penambahan zat penginduksi baik tunggal maupun kombinasi tersebut dimaksudkan untuk meningkatkan pertumbuhan sel-sel EB yang mengekspresikan faktor neurogenik⁽²⁰⁾. Pada beberapa studi dilaporkan bahwa penambahan zat penginduksi tersebut dapat dilakukan setelah didapatkan EB dan terbentuk *neurosphere* dengan tujuan untuk meningkatkan ekspresi sel neuron⁽²¹⁾.

Sel *feeder* seringkali digunakan dengan tujuan untuk meningkatkan diferensiasi ESC menjadi sel neurogenik. Diferensiasi neuroektoderm dalam medium CDM (*chemically defined medium*) sangat dipengaruhi oleh densitas sel dalam *plate*. Pada beberapa penelitian dilaporkan bahwa NEB (*neurogenic EB*) tumbuh lebih cepat pada kultur dengan densitas sel tertentu. Di samping itu, mediator FGF2 berpengaruh pada pertumbuhan prekursor sel neuron⁽¹⁵⁾.

Medium Bebas Serum

Faktor yang berperan dalam keberhasilan pertumbuhan sel secara *in vitro* antara lain lingkungan kultur. Kondisi dan pengaturan lingkungan kultur terdiri atas substrat, medium, gas, dan suhu. Komposisi medium dapat mempengaruhi arah pertumbuhan sel yang dikultur. Medium yang dibutuhkan dalam kultur pada umumnya membutuhkan bahan-bahan tambahan yang sesuai untuk tipe sel tertentu. Bahan-bahan tambahan tersebut antara lain asam amino, vitamin, garam-garaman, glukosa, suplemen organik, hormon dan *growth factor*, antibiotik serta serum. Serum mengandung sejumlah bahan-bahan yang dibutuhkan yaitu sumber protein, hormon, dan *growth factor*; namun konsentrasi masing-masing komponen yang terdapat di dalam serum sering kali tidak dapat diketahui pasti⁽²⁾. Hal ini sering mempengaruhi proses analisis penelusuran dari mediator tertentu yang mempengaruhi terjadinya diferensiasi sel menjadi sel neuron; sehingga evaluasi dan penentuan faktor yang mempengaruhi sel-sel untuk berdiferensiasi menjadi neuron akan menjadi sulit. Oleh karena itu dikembangkanlah metode kultur dengan medium bebas serum, dengan harapan akan didapatkan sel-sel neuron yang bebas kontaminasi produk hewan dan pertumbuhannya dapat diruntut secara akurat. Sebagai contoh, kultur *neural precursor cell* (NPC) dapat tumbuh secara selektif dan berproliferasi pada medium bebas serum⁽²²⁾. Selain itu ESC juga dikultur dalam medium bebas serum untuk diferensiasi neural^(23,24).

Beberapa penelitian lain juga telah memanfaatkan medium bebas serum pada medium pengarahan ESC untuk mendapatkan sel prekursor neural. Penelitian-penelitian tersebut antara lain sebagai berikut:

Bouhon dkk. menggunakan CDM untuk mengkultur *neurogenic embryoid bodies* (NEB). Karakterisasi sel dilakukan dengan pengujian imunositokimia, *flow cytometry*, RT PCR untuk profil gen yang terekspresi. Penambahan FGF2 pada medium CDM menyebabkan diameter *neurosphere* bertambah. Ekspresi gen-gen dalam NEB tergolong heterogen, sehingga FGF2 eksogen masih diperlukan⁽¹⁵⁾.

Krichevsky dkk. meneliti peranan microRNA (miRNA) pada diferensiasi sel progenitor neural menjadi sel neuron dan astrosit dengan melihat profil ekspresinya. Transfeksi miRNA dilakukan dengan menambahkan suatu reagen ke dalam *cell line* D3 yang ditumbuhkan dalam medium N2 bebas serum. Ekspresi miRNA dilihat dengan menggunakan *northern blot* dan *flow cytometry*, juga didukung dengan pengujian imunositokimia dan *western blot*. Hasilnya menunjukkan bahwa miRNA berperan dalam diferensiasi sel menjadi sel progenitor neural⁽²⁵⁾.



Dihne dkk. meneliti pembentukan teratoma saat transplantasi sel-sel prekursor neural pada striatum mencit. Sel prekursor neural *monolayer* ditumbuhkan dalam medium bebas serum dengan penambahan FGF2 pada substrat poly L ornithine. Hasil menunjukkan bahwa pembentukan teratoma menurun hingga 17% dengan transplantasi SENA (*substrate adherent ES cell-derived neural aggregate*). SENA merupakan sel predominan prekursor neural. Pembentukan teratoma berhubungan dengan kematangan sel yang akan ditransplantasikan dengan pembentukan tumor ⁽²⁶⁾.

Yue dkk. mengujikan metode kokultur ESC primata dengan sel Sertoli tikus sebagai *feeder layer* pada medium bebas serum. Sel Sertoli digunakan dalam teknik kokultur, karena juga menghasilkan GDNF (*Glial cell derived neurotrophic factor*). GDNF diyakini dapat menstimulasi pertumbuhan ESC menjadi sel neural. Karakterisasi terhadap ekspresi sejumlah protein dilakukan dengan uji imunohistokimia, *western blot*, dan mikroskop elektron ⁽²⁷⁾.

Medium bebas serum dalam kultur ESC sangat berperan dalam diferensiasi sel prekursor neural menjadi sel-sel yang neurogenik. Dengan menambahkan bahan-bahan tertentu yang berperan sebagai mediator pertumbuhan, faktor yang berperan dalam sistem kultur pengarah dapat diketahui. Dengan demikian penerapan medium bebas serum untuk pengarah ESC dapat membantu aplikasi ESC untuk tujuan terapeutik.



DAFTAR PUSTAKA

1. Priosoeryanto BP. Penggunaan teknik biakan sel dalam berbagai pengujian di bidang biomedis. Dalam Pelatihan Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia. FKH IPB, 2003.
2. Djuwita I. Biologi kultur jaringan. Dalam Pelatihan Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia. FKH IPB, 2003.
3. Fahrudin M. Pembuatan (iniasi) kultur primer. Dalam Pelatihan Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia. FKH IPB, 2003.
4. Matahine T, Boediono A. Peluang dan tantangan penggunaan stem cells untuk terapi regeneratif. *Med Vet Indones* 2006;10:31-38.
5. Choi D, Lee HJ, Jee S. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: Enrichment of endodermal cells in the embryoid body. *Stem Cells* 2005;23:817-27.
6. Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage through a default mechanism. *Neuron* 2001;30:65-78.
7. Mattson MP, Chan SL, Duan W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet and behavior. *Physiol Rev* 2002;82:637-72.
8. Puente LG, Borris DJ, Carriere JF, Kelly JF, Megeny LA. Identification of candidate regulators of embryonic stem cell differentiation by comparative phosphoprotein affinity profiling. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:57-67.
9. Laeisz CS, Lang S, Chalaris A. Forced dimerization of gp130 leads constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2006;17:2986-95.
10. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005;85:635-78.
11. Ateghang B, Wartenberg M, Gassmann M, Sauer H. Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1 α and intracellular reactive oxygen species. *J Cell Sci* 2006;119:1043-52.
12. Nakashima K, Wiese S, Yanagisawa M. Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* 1999;13:5429-34.
13. Gregg C, Weiss S. CNTF/LIF/gp130 receptor complex signaling maintains a VZ precursor differentiation gradient in the developing ventral forebrain. *Development* 2005;132:565-78.
14. Montcouquiol M, Crenshaw EB, Kelley MW. Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:363-86.
15. Bouhon IA, Kato H, Chandran S, Allen ND. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in chemically defined medium. *Brain Res Bull* 2005;68:62-75.
16. Rathjen J, Halnes BP, Hudson KM, Nesci A, Dunn S, Rathjen PD. Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineage: Homogeneous formation and differentiation of neuroectoderm population. *Development* 2002;129:2649-61.
17. Murashov AK, Pak ES, Hendricks WA, Owensby JP, Sierpinski PL, Tatko LM, Fletcher PL. Directed differentiation of embryonic stem cells into dorsal interneuron. *FASEB J* 2005;19:252-64.
18. Zhang P, Chebath J, Lonal P, Renel M. Enhancement of oligodendrocyte differentiation from murine embryonic stem cells by an activator of gp 130 signalling. *Stem Cells* 2004;22:344-54.
19. Liu S, Qu Y, Stewart TJ. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6126-31.
20. Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 1995;108:3181-88.
21. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433-38.
22. Bain G, Kitchens D, Yao M. Embryonic stem cells express neural properties in vitro. *Dev Biol* 1995;168:342-357.
23. Kawasaki H, Mizuseki K, Sasai Y. Selective neural induction from ESC by stromal cell derived inducing activity and its potential therapeutic application in Parkinson's disease. *Meth Mol Biol* 2002;185:217-227.
24. Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C. Direct neural fate specification from ESC: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through default mechanism. *Neuron* 2001;30:65-78.
25. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 2006;24:857-864.
26. Dihne M, Bernrath C, Hagel C. Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain. *Stem Cells* 2006;24:1458-1466.
27. Yue F, Cui L, Johkura K. Induction of midbrain dopaminergic neurons from primate embryonic stem cells by coculture with sertoli cells. *Stem Cells* 2006;24:1695-1706.