

Metode Isolasi *Inner Cell Mass* sebagai Sumber *Embryonic Stem Cell*

Dwi Agustina, Caroline T. Sardjono, Ferry Sandra

*Stem Cell and Cancer Institute, Kalbe Pharmaceutical Company
Jakarta, Indonesia*

ABSTRAK

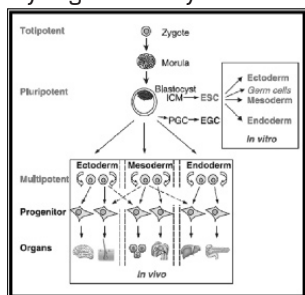
Embryonic stem cell (ESC) merupakan sumber *stem cell* yang berasal dari embrio stadium blastosis; bagian yang diisolasi adalah *inner cell mass* (ICM) yang bersifat pluripoten. Sampai saat ini terdapat beberapa metode untuk mengisolasi ICM, baik dari hewan maupun manusia. Metode isolasi ICM tersebut adalah metode *immunosurgery*, *microsurgery*, enzimatik, dan laser. Perlu juga diperhatikan metode penghilangan zona pellucida dari blastosis sebelum isolasi ICM dilakukan. Setiap metode penghilangan zona pellucida dan isolasi ICM tersebut memiliki kelebihan dan kelemahan tersendiri. Penentuan penggunaan metode-metode tersebut tergantung pada tujuan penelitian yang akan dilakukan.

Kata Kunci: Inner cell mass, isolasi, embryonic stem cell

Pendahuluan

Stem cell adalah sel pembangun setiap organ dan jaringan tubuh kita; merupakan sel yang belum berdiferensiasi dan dengan kondisi tertentu dapat berproliferasi serta berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel dengan fungsi khusus. Sumber *stem cell* yang saat ini sering digunakan untuk penelitian biomedis adalah *stem cell* yang berasal dari embrio atau *embryonic stem cell* (ESC).¹¹

Karakteristik unik yang dimiliki oleh ESC dibandingkan jenis *stem cell* lainnya adalah kemampuannya untuk berproliferasi selama periode yang panjang. Selain itu, pada kondisi kultur tertentu, jenis *stem cell* ini dapat diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi semua jenis sel tubuh yang merupakan turunan dari tiga lapis kecamabah, yaitu ektoderm, mesoderm, dan endoderm. Kemampuan tersebut disebabkan sifat pluripoten atau daya plastisitas yang dimilikinya.^{2, 19}



Gambar 1. Hirarki *embryonic stem cell*.¹⁹

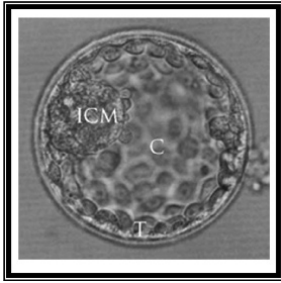
ESC dapat diperoleh dengan mengisolasi *inner cell*

mass (ICM) dari embrio stadium blastosis, yaitu pada hari ke empat perkembangan embrio mencit dan hari ke lima pada perkembangan embrio manusia. Sel-sel ICM tersebut jika dikultur dan dikembangkan dengan kondisi tertentu akan menghasilkan *stem cell* yang belum berdiferensiasi dan bersifat pluripoten. *Stem cell* inilah yang memiliki kemampuan untuk memperbanyak dirinya sendiri, berproliferasi, dan dapat berdiferensiasi menjadi berbagai macam jenis sel yang terdapat dalam tubuh.^{4,19,20}

Pada perkembangan embrionik, stadium blastosis terbentuk saat terdapat rongga di antara sel-sel morula yang berisi cairan yang disebut blastosol. Blastosis tersusun oleh dua jenis sel, yaitu trofektoderm yang terdapat di bagian luar dan ICM di bagian dalam. Sel-sel ICM akan berkembang menjadi semua jaringan tubuh embrio, dan juga jaringan nontrofoblas yang menunjang perkembangan embrio (jaringan ekstraembrionik, termasuk kantung kuning telur, allantois, dan amnion). Trofektoderm akan menghasilkan sel-sel trofoblas korion, yang selanjutnya akan berkembang menjadi plasenta.^{11,20}

Isolasi *Inner Cell Mass* (ICM)

Isolasi dimaksudkan untuk memisahkan sel-sel ICM dari sel-sel trofektoderm. ICM merupakan sel-sel yang belum berdiferensiasi dan memiliki potensi untuk membentuk semua jenis sel tubuh, sedangkan sel-sel trofektoderm sudah berdiferensiasi dan hanya



Gambar 2. Bagian-bagian embrio stadium blastosis: ICM (*Inner Cell Mass*), T (Trofoblas), dan C (Blastosol).⁵

berpotensi untuk membentuk plasenta. Karakteristik inilah yang menjadi alasan untuk memisahkan kedua jenis sel tersebut. ICM digambarkan sebagai suatu koloni dengan ukuran sel yang kecil, memiliki nukleus berukuran besar, dan sitoplasma yang sedikit. ICM yang diperoleh kemudian dapat dikultur dengan tetap mempertahankan sifat *undifferentiated* yang dimilikinya.⁷

⁷

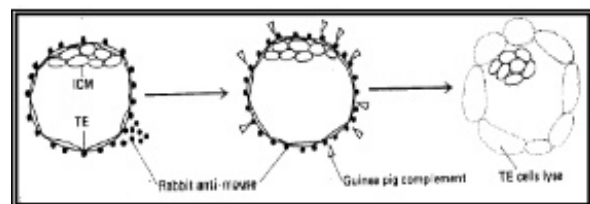
Terdapat beberapa metode isolasi ICM yang telah dikenal dan dilakukan oleh para peneliti hingga saat ini, yaitu metode *immunosurgery*, pembedahan mikro atau *microsurgery*, enzimatis, dan dengan menggunakan sinar laser. Perbedaan dari tiap-tiap metode tersebut adalah alat dan bahan yang digunakan, perlakuan serta waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan ICM.^{5, 8, 13, 14, 17}

Pemilihan penggunaan metode isolasi ICM dapat dilakukan dengan melihat kualitas dari blastosis yang akan diisolasi ICM-nya. Kualitas blastosis yang membentuk ICM merupakan faktor penting yang mempengaruhi keberhasilan dalam perkembangan kultur ESC. Blastosis dengan ICM yang terlihat jelas dan ukurannya cukup besar dapat menggunakan metode *immunosurgery* untuk mengisolasi ICM. Blastosit dengan ICM yang terlihat jelas namun ukurannya lebih kecil bila dibandingkan dengan yang pertama dapat menggunakan metode *microsurgery*. Selain dari kualitas blastosis, penggunaan metode pengisolasi ICM dipilih berdasarkan asal blastosis serta tujuan dari masing-masing penelitian. Penelitian ESC saat ini yang menggunakan blastosis manusia telah mengurangi adanya kontak dengan bahan-bahan yang berasal dari hewan, seperti antibodi dan serum. Oleh karena itu pemilihan metoda pengisolasi ICM perlu diperhatikan dengan baik.^{1, 7, 8, 12, 14-16, 21}

Beberapa metode di atas memerlukan proses penghilangan *zona pellucida* terlebih dahulu untuk mempermudah dalam proses pengisolasi ICM. Bahan yang biasanya digunakan untuk menghilangkan *zona pellucida* blastosis adalah enzim pronase 0.25% - 0.5%. Pada penelitian yang menggunakan blastosis manusia, penggunaan pronase digantikan dengan *Tyrode's*

acid. Hal ini dilakukan untuk mengurangi kontak blastosis dengan bahan-bahan yang berasal dari hewan. Namun penggunaan *Tyrode* memerlukan penanganan yang cepat agar blastosis tidak terlalu lama terpapar dengan larutan asam tersebut. Setelah *zona pellucida* lisis akibat kontak dengan *Tyrode's acid*, blastosis dicuci beberapa kali untuk menghilangkan sisa-sisa asam yang tertinggal. Isolasi ICM siap dilakukan.^{1, 3, 9, 14, 20}

Metode *immunosurgery* merupakan metode isolasi ICM dengan menggunakan antibodi yang mengenali trofektoderm. Metode ini sudah dilakukan sejak tahun 1975 oleh Solter dan Knowles. *Immunosurgery* dapat melisis sel-sel trofektoderm sehingga sel-sel ICM yang terdapat di dalamnya dapat dengan mudah diisolasi untuk kemudian dikultur dalam medium yang mengandung LIF atau MEF untuk membentuk koloni ESC. Isolasi ICM dengan metode *immunosurgery* dilakukan dengan menginkubasi blastosis tanpa zona dalam *rabbit anti-mouse antibody* (untuk ESC dari embrio mencit) atau *rabbit anti-human antibody* (untuk ESC dari embrio manusia) dan *complement sera from guinea pig*, masing-masing 30 menit pada 37°C, 5% CO₂. Penggunaan antibodi dalam metode ini disesuaikan dengan blastosis yang digunakan, dimana antibodi yang mengenali trofektoderm akan melisis sel-sel tersebut.

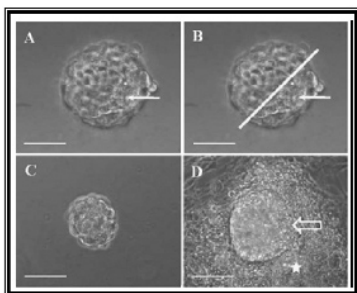


Gambar 3. Metode *immunosurgery* untuk mengisolasi ICM dari blastosis mencit. Mula-mula blastosis diinkubasi dalam *rabbit anti-mouse serum*, dicuci, kemudian diinkubasi dengan *guinea pig complement*. Sel-sel trofoblas akan lisis dan ICM dapat diisolasi.⁶

Berdasarkan kualitas blastosit, *immunosurgery* hanya dapat dilakukan pada blastosis yang memiliki ICM yang terlihat jelas dan berukuran cukup. Untuk blastosit yang memiliki ICM dalam jumlah sedikit, penggunaan metode *immunosurgery* untuk mengisolasi ICM menjadi tidak optimal karena dikhawatirkan ICM akan hilang selama proses *immunosurgery* berlangsung. Penggunaan metode *immunosurgery* sudah jarang dilakukan pada penelitian akhir-akhir ini, terutama penelitian ESC yang menggunakan blastosis manusia. Hal ini dilakukan untuk mengurangi kontak kultur sel dengan bahan-bahan yang berasal dari hewan, yaitu antibodi dan serum. Selain itu, medium yang digunakan juga bebas dari bahan-bahan yang berasal dari hewan, seperti serum. Perlakuan ini

bertujuan untuk mengurangi adanya kontaminasi dari bahan-bahan yang berasal dari hewan dan pengaruhnya terhadap tubuh yang menerima transplantasi sel-sel hasil diferensiasi dari ESC.^{1, 6-8, 12, 14-16, 21}

Metode *microsurgery* dapat dilakukan pada blastosis yang memiliki ICM yang terlihat jelas namun jumlahnya lebih sedikit dibandingkan blastosis yang berkualitas baik pada umumnya. Blastosis tersebut memiliki resiko yang tinggi untuk kehilangan ICM selama proses isolasi apabila dilakukan dengan metode *immunosurgery*. Metode *microsurgery* untuk mengisolasi ICM dilakukan dengan bantuan mikromanipulator, dimana dibuat beberapa sayatan pada *zona pellucida* membentuk bukaan berbentuk segitiga atau persegi. Selama proses ini berlangsung, blastosis ditahan dengan menggunakan *holding pipette* pada sisi yang lainnya. *Finely-drawn glass pipette* kemudian digunakan untuk mengisolasi ICM melalui sayatan tersebut. Dapat pula dilakukan pemotongan terhadap blastosis tanpa zona untuk memisahkan bagian yang berisi ICM dengan bagian lainnya. Setelah pemotongan, ICM diisolasi dengan *finely-drawn glass pipette*. ICM yang telah diisolasi dapat dikultur lebih lanjut.^{6, 7}



Gambar 4. Metode *microsurgery* untuk mengisolasi ICM dengan menggunakan teknik pemotongan blastosis. (a) Blastosis tanpa zona, (b) Pemotongan pada bagian yang ditandai untuk memisahkan daerah yang mengandung ICM, (c) ICM yang telah diisolasi, (d) Perkembangan hari ke-7 dari ICM dengan trofektoderm yang mengelilinginya. Garis panah: ICM, Bintang: trofektoderm. Skala = 100 μ m.⁷

Penggunaan metode *microsurgery* dianggap lebih menguntungkan untuk isolasi ESC dari manusia karena tidak menimbulkan kontak antara blastosis dengan antibodi yang berasal dari hewan yang umumnya digunakan pada proses *immunosurgery*. Namun, kelemahan dari metode ini adalah terbawanya sel-sel trofektoderm yang dapat mempengaruhi dan menghambat pertumbuhan kultur ICM itu sendiri. Selain itu teknik mekanik ini agak rumit dan memerlukan keterampilan dan pengalaman dalam menggunakan mikromanipulator.^{5, 6, 7}

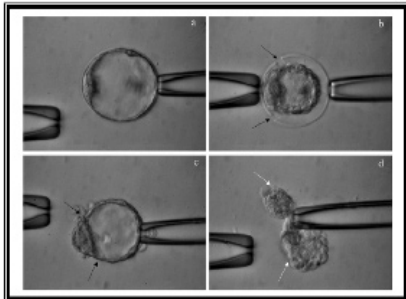
Untuk mengisolasi ICM secara enzimatik, mula-mula blastosis tanpa zona dikultur dalam medium kultur

ESC dengan menggunakan *feeder layer* dan dibiarkan terjadi perlekatan pada *monolayer*. Medium kultur diganti setiap harinya. Pemisahan ICM dari trofektoderm baru dilakukan secara enzimatik setelah sel-sel trofektoderm menyebar membentuk *monolayer* dan bentuk ICM sudah dapat diidentifikasi. Setelah 5-7 hari, ICM akan membentuk koloni besar yang dikelilingi oleh sel-sel trofektoderm. Isolasi ICM dengan metode enzimatik dilakukan dengan memaparkan blastosis tanpa zona tersebut dalam larutan 0.25% trypsin - 1nM EDTA selama 10 menit. Setelah terpisah dari trofektoderm, ICM dapat dikultur lebih lanjut. Dalam proses enzimatik ini perlu dilakukan pengamatan embrio-embrio tersebut dibawah mikroskop selama perlakuan. Pada saat trofektoderm mulai terpisah, perlakuan sebaiknya dihentikan dan ICM diisolasi. Hal ini dikarenakan adanya pengaruh negatif pada kultur sel ICM apabila terlalu lama terpapar dengan enzim trypsin.¹³

Pemakaian bahan-bahan yang berasal dari hewan pada kultur sel manusia memiliki resiko yang besar terjadinya kontaminasi *xenogenic* atau *allogenic*. Pengisolasian dengan metode *immunosurgery* yang menggunakan komplemen dan antibodi yang berasal dari hewan dapat memunculkan epitop yang tidak diinginkan pada kultur ESC dan mempengaruhi aplikasinya ke depan. Isolasi ICM dengan menggunakan sinar laser merupakan alternatif untuk menghindari terjadinya kontaminasi pada kultur ESC. Namun penggunaan teknik ini memerlukan peralatan laser yang cukup mahal. Mula-mula blastosis ditahan dengan 2 *holding pipette* pada kedua sisinya. ICM diposisikan pada arah jam 9. Sinar laser ditembakkan pada kedua sisi blastosis untuk memisahkan blastosis dari *zona pellucida*. Kemudian blastosis kembali ditahan dengan 2 *holding pipette* dan ICM diposisikan pada arah jam 9. Sinar laser kembali ditembakkan pada kedua sisi blastosis untuk memisahkan blastosis menjadi dua bagian, yaitu bagian kecil yang mengandung ICM serta bagian yang besar dimana sebagian besar mengandung trofoblas.^{10, 17}

Pada penelitian untuk mendapatkan sel lestari dari ESC manusia, pronase digunakan untuk menghilangkan *zona pellucida* dan pengisolasian ICM dari blastosis dilakukan dengan metode *immunosurgery*. Bagaimana pun juga, *immunosurgery* bukanlah metode yang optimal apabila blastosis yang akan diisolasi ICM-nya memiliki kualitas yang tidak baik. Selain itu, penggunaan metode *immunosurgery* yang melibatkan bahan-bahan yang berasal dari hewan, seperti *mouse antibodies* dan *guinea pig complement*, perlu dipikirkan resiko terjadinya kontaminasi *xenogenic* atau *allogenic*

serta pengaruhnya saat dilakukan transplantasi sel. Oleh karena itu, para peneliti melakukan modifikasi untuk mengisolasi ICM dari blastosis. Antara lain dengan penggunaan asam tyrode untuk menghilangkan *zona pellucida* serta mengisolasi ICM secara mekanik. Modifikasi tersebut merupakan salah satu cara untuk mengurangi kontak blastosis dengan bahan-bahan yang berasal dari hewan, seperti pronase, antibodi dan faktor komplemen.^{10,14,1}



Gambar 5. Pemotongan dengan laser. Blastosis ditahan dengan 2 *holding pipette* pada kedua sisinya, dimana ICM diposisikan pada arah jam 9 sebelum (a) dan sesudah (b) dipotong dengan sinar laser. Blastosis kembali ditembak dengan sinar laser (c) untuk memisahkan blastosis menjadi 2 bagian, bagian kecil yang mengandung ICM (panah putih) dan bagian besar yang mengandung trofoblas (panah kuning).
Skala = 30 μ m.

KESIMPULAN

Embryonic stem cell (ESC) merupakan salah satu sumber *stem cell* yang berasal dari embrio stadium blastosis. ESC dapat diperoleh dengan mengisolasi *inner cell mass* (ICM), dimana isolasi dimaksudkan untuk memisahkan sel-sel ICM dari sel-sel trofektoderm. Terdapat beberapa metode pengisolasian ICM yang telah dikenal dan dilakukan oleh para peneliti hingga saat ini, yaitu metode *immunosurgery*, pembedahan mikro atau *microsurgery*, enzimatik, dan dengan menggunakan sinar laser. Beberapa metode di atas memerlukan proses penghilangan *zona pellucida* terlebih dahulu untuk mempermudah dalam proses pengisolasian ICM. Bahan-bahan yang biasanya digunakan untuk menghancurkan *zona pellucida* blastosis adalah enzim pronase serta *Tyrode's acid*. Setiap metode penghilangan *zona pellucida* dan isolasi ICM memiliki kelebihan dan kelemahan tersendiri. Misalnya penggunaan metode yang melibatkan bahan-bahan yang berasal dari hewan, seperti *mouse antibodies* dan *guinea pig complement*, perlu dipikirkan resiko terjadinya kontaminasi *xenogenic* atau *allogenic* serta pengaruhnya saat dilakukan transplantasi sel. Pada akhirnya penen-

uan penggunaan metode-metode tersebut tergantung pada tujuan dari penelitian yang akan dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adjaye J, Huntriss J, Herwig R, et al. Primary Differentiation in the Human Blastocyst: Comparative Molecular Portraits of Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 1514-1525.
2. Anonim. C. Introduction. 2004; http://www.unige.ch/cyberdocuments/these2004/HeG/these_body.html. [18 Oktober 2006].
3. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, et al. Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *N Engl J Med*. 2004; 350: 13.
4. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic Stem Cells: A Promising Tool for Cell Replacement Therapy. *J. Cell. Mol. Med*. 2004; 8 (4): 465-473.
5. Georgiades P, Rossant J. *Ets2* is necessary in trophoblast for normal embryonic anteroposterior axis development. *Development*. 2006; 133: 1059-1068.
6. Hogan B, Constantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. 1986. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
7. Kim HS, Oh SK, Park YB, et al. Methods for Derivation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Express*, published online July 28, 2005; doi:10.1634/stemcells.2004-0296.
8. Lee JB, Lee JE, Park JH, et al. Establishment and Maintenance of Human Embryonic Stem Cell Lines on Human Feeder Cells Derived from Uterine Endometrium under Serum-Free Condition. *Biology of Reproduction*. 2005; 72: 42-49.
9. Mansour RT, Rhodes CA, Aboulghar MA, Serour GI, Kamal A. Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. *Human Reproduction*. 2000; 15 (5): 1061-1064.
10. Moon SY, Park YB, Kim D-S, Oh SK, Kim D-W. Generation, Culture, and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells for Therapeutic Applications. *Molecular Therapy*. 2006; 13 (1): 5-14.
11. National Institutes of Health. Stem cells: Scientific progress and future research directions. 2001; <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>. [1 Maret 2003].
12. Park S-P, Lee YJ, Lee KS, et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Human Reproduction*. 2004; 19 (3): 676-684.
13. Schoonjans L, Kreemers V, Danloy S, et al. Improved Generation of Germline-Competent Embryonic Stem Cell Lines from Inbred Mouse Strains. *Stem Cells*. 2003; 21: 90-97.
14. Skottman H, Hovatta O. Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2006; 132: 691-698.
15. Solter D and Knowles BB. *Immunosurgery of Mouse Blastocyst*. 1975. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 72 (12): 5099-5102.
16. Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2004; 128: 259-267.
17. Tanaka N, Takeuchi T, Neri QV, Sills ES, Palermo GD. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *Journal of Translational Medicine*. 2006; 4: 20.
18. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapir SS. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. 1998. *Science*; 282: 1145-1147.
19. Wobus AM and Boheler KR. Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*. 2005; 85: 635-678.
20. Yu J, Thomson JA. *Regenerative Medicine* 2006: 1. Embryonic stem cells. 2006; <http://www.nih.gov>. [14 Januari 2007].
21. Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, et al. Derivation of Human Embryonic Stem Cells from Developing and Arrested Embryos. *Stem Cells*. 2006; 24: 2669-2676.