

## Ekspresi Gen Bax pada *Inner Cell Mass* (ICM) Mencit Pasca Vitrifikasi

RATIH RINENDYAPUTRI<sup>1</sup>, HOLY ARIF WIBOWO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI  
Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat, Indonesia. 10560  
Email: [ratih79@yahoo.com](mailto:ratih79@yahoo.com)

### ABSTRACT

Inner Cell Mass (ICM) is a source of embryonic stem cells (ESC, embryonic stem cell). Inner Cell Mass can be isolated from blastocyst stage embryos are then cultured in vitro to obtain ESC colonies. Studies to explore the potential of ESC continues to do, the limited of this source the development of stem cell storage technologies as vitrification was needed. The effectiveness of vitrification on embryo provides an opportunity to use this method to store frozen at ICM. ICM is a collection of some of the cells that store the viability after freezing is important. This study aims to determine the effectiveness of the vitrification method by observing viability ICM and ICM Bax gene expression post-vitrification. The study was conducted at the Stem Cell Laboratory of Center for Biomedical and Basic Thecnolgy of Health. The event begins with the isolation of ICM from blastocyst embryos, vitrification using ethylene glycol (EG) and dimethyl sulphoxide (DMSO) respectively 15% in 20% FBS Mpbs + 0.5 M sucrose thawing be done in stages using a using a 0.5 M , 0.25 M and 0.125 respectively for 2 minutes. Furthermore, the ICM was cultured and the expression of the Bax gene was observed by extracting mRNA for the Bax gene followed by real time PCR. For viability, staining was performed with Hoechst and propidium iodide/PI. The results showed that post-vitrified ICM viability was lower than control ( $p < 0.05$ ) and there was an increase in Bax gene expression after vitrification on day 7 of culture ( $p > 0.05$ ). In this research, vitrification can be used for frozen storage of ICM.

Keywords: gen Bax; embryonic stem cell primary colonies; inner cell mass; vitrification

### INTISARI

*Inner Cell Mass* (ICM) merupakan sumber sel punca embrionik (ESC, *embryonic stem cell*). *Inner Cell Mass* dapat diisolasi dari embrio tahap blastosis yang kemudian dikultur secara in vitro untuk mendapatkan koloni ESC. Penelitian-penelitian untuk menggali potensi ESC terus dilakukan, mengingat terbatasnya sumber tersebut maka perlu pengembangan teknologi penyimpanan sel punca atau *stem cell banking* seperti vitrifikasi. Efektivitas vitrifikasi pada embrio memberikan peluang terhadap penggunaan metode ini untuk simpan beku pada ICM. ICM merupakan sekumpulan beberapa sel sehingga viabilitas pasca simpan beku merupakan hal penting. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas metode vitrifikasi pada ICM dengan mengamati viabilitas dan ekspresi gen Bax ICM pasca vitrifikasi. Penelitian dilakukan di Laboratorium *stem cell* Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbangkes. Kegiatan diawali dengan melakukan isolasi ICM dari embrio blastosis, vitrifikasi menggunakan *ethylen glycol* (EG) dan *dimethyl sulphoxide* (DMSO) masing-masing 15% dalam mPBS FBS 20% + sukrosa 0,5 M. *Thawing* dilakukan secara bertahap menggunakan menggunakan 0,5 M, 0,25 M dan 0,125 masing-masing selama 2 menit. Selanjutnya ICM dikultur dan diamati ekspresi gen Bax dengan melakukan ekstraksi mRNA terhadap gen Bax dilanjutkan dengan *real time* PCR. Untuk viabilitas dilakukan pewarnaan dengan Hoechst dan propidium iodide/PI. Hasil menunjukkan bahwa viabilitas ICM pasca vitrifikasi lebih rendah dibandingkan kontrol ( $p < 0,05$ ) dan terjadi peningkatan ekspresi gen Bax pasca vitrifikasi pada hari ke 7 kultur ( $p > 0,05$ ). Pada penelitian ini vitrifikasi dapat digunakan untuk simpan beku ICM.

Kata kunci : gen Bax; *inner cell mass*; koloni primer *embryonic stem cell*; vitrifikasi

### PENDAHULUAN

*Inner Cell Mass* (ICM) merupakan sumber sel punca embrionik (ESC, *embryonic stem cell*). *Inner Cell Mass* dapat diisolasi dari embrio tahap blastosis yang kemudian dikultur secara in vitro untuk mendapatkan koloni ESC. Sifat pluripotensi ESC tidak hanya

membuka peluang sebagai sel terapi pada pengobatan degeneratif, tetapi juga berpotensi menjadi objek penelitian perkembangan ilmu dasar dan sel diagnostik sebagai uji toksisitas dalam bidang farmakologi (Wobus & Löser, 2011). Penelitian-penelitian untuk menggali potensi ESC terus dilakukan, mengingat

terbatasnya jumlah dan sumber sel punca maka harus diimbangi dengan pengembangan teknologi penyimpanan sel punca atau (*stem cell banking*) (Sun *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2021).

Vitrifikasi pada embrio maupun sel telur merupakan metode simpan beku/kriopreservasi yang telah dilaporkan aman, efektif dan telah secara rutin dilakukan (Najafzadeh *et al.*, 2021). Keberhasilan tersebut memberikan peluang untuk melakukan vitrifikasi pada ICM. Mengingat ICM terdiri dari sejumlah kecil koloni sel, merupakan tantangan untuk menyimpannya dengan metode vitrifikasi. Pada kultur embrio secara *in vitro* insiden apoptosis meningkat pada ICM dibandingkan pada sel-sel trofoblas dan jumlah sel ICM menurun pada embrio paska vitrifikasi (Inaba *et al.*, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa ICM merupakan sel yang sangat sensitif terhadap proses kriopreservasi dan kultur *in vitro*.

Menurut Inaba *et al.* (2016) pada simpan beku embrio dapat menyebabkan kematian sel (apoptosis). Kematian sel dapat terjadi akibat pembentukan kristal es, syok osmotik, produksi *reaction oxygen species* (ROS) dan toksisitas krioprotektan yang menimbulkan kerusakan membran sel dan beberapa organel intraseluler sehingga memicu terjadinya mekanisme nekrosis dan apoptosis (Ichikawa *et al.*, 2012). Kematian sel oleh mekanisme apoptosis ditandai dengan adanya perubahan morfologi dan degradasi DNA atau dengan mengukur keseimbangan pembentukan Bax dengan Bcl<sub>2</sub> (Madden *et al.*, 2011). Proses apoptosis merupakan proses alami yang terjadi pada embrio *in vivo* maupun embrio *in vitro* (Inaba *et al.*, 2016). Namun ada beberapa kondisi lingkungan yang dapat memicu apoptosis seperti terpapar zat kimia, radiasi sinar UV, obat antikanker, perubahan suhu dan krioprotektan yang bersifat toksik terhadap sel (Wulandari E., 2011).

Tingkat keberhasilan kriopreservasi menggunakan metode vitrifikasi berbeda-beda pada tiap jenis sel, maka perlu dilakukan penelitian penggunaan metode vitrifikasi pada ICM. Untuk mengetahui efektivitas metode ini

dapat dilakukan dengan mengamati viabilitas ICM pasca vitrifikasi serta mengamati ekspresi gen Bax yang merupakan salah satu gen yang berperan dalam proses kematian sel (apoptosis). Dalam penelitian ini akan dilakukan pengamatan terhadap ekspresi gen Bax dan viabilitas ICM pasca vitrifikasi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell* Pusat Teknologi Dasar Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan–Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dari bulan Maret-Desember 2020. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi:

### 1. Isolasi embrio dan *Inner Cell Mass* (ICM) tahap blastosis

Mencit betina disinkronisasi dan disuperovulasi menggunakan 5IU PMSG (Foligon, Intervet, Netherland) dan 5 IU hCG (Foligon, Intervet, Netherland) secara intraperitonium sampai dengan isolasi blastosis dan isolasi ICM tahapan ini dilakukan sesuai dengan Rinendyaputri & Boediono (2013).

### 2. Vitrifikasi dan kultur ICM

Vitrifikasi dan *warming* ICM serta kultur dilakukan sesuai dengan Rinendyaputri & Boediono (2013).

### 3. Ekstraksi dan RT PCR gen Bax dari ICM

Proses isolasi RNA 3 jam, 2 hari (48 jam), dan 7 hari (168 jam) dilakukan dengan menggunakan manual kit (Qiagen, #52906). Hasil isolasi RNA dilanjutkan dengan uji kualitas menggunakan spektrofotometri yaitu kualitas menggunakan spektrofotometri yaitu menggunakan Nanodrop™, hal ini bertujuan untuk evaluasi hasil isolasi baik konsentrasi maupun kemurniannya. Pengujian kemurnian RNA total dilakukan dengan membandingkan nilai A260 dan A280. Rasio A260/A280 yang baik adalah 1.88-2.00 artinya RNA hasil isolasi bebas dari kontaminasi protein. Hasil spektrofotometri yang positif dilanjutkan dengan proses amplifikasi.

Amplifikasi material genetik RNA dilakukan 2 tahap yaitu 1) pengubahan RNA menjadi cDNA atau RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) menggunakan kit (Invitrogen, 12574-026) dan

2) amplifikasi cDNA menggunakan realtime PCR dengan SYBR Green PCR Master Mix (AB, #4385610). Tahap pertama dilakukan pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 30 menit dan 95<sup>0</sup>C selama 5 menit. Sedangkan amplifikasi tahap kedua *holding stage* dilakukan pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 20 detik, *cycling stage* 95<sup>0</sup>C selama 3 detik dan 63<sup>0</sup>C selama 1 menit, dilanjutkan dengan *Melt curve stage* 95<sup>0</sup>C selama 15 detik, 60<sup>0</sup>C selama 1 menit, 95<sup>0</sup>C selama 30 detik, dan 60<sup>0</sup>C selama 15 detik.

Amplifikasi cDNA menggunakan mesin *Applied Biosystem 7500 fast Realtime PCR system* (AB 7500 realtime PCR) dengan primer spesifik gen Bax yaitu, forward 5'-GGAGCAGCTTGGGAGCG-3' dan reverse 5'AAAAGGCCCTGTCTTCATGA-3'.<sup>13</sup>

Primer yang digunakan primer spesifik yang telah dibuktikan dengan pengecekan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada gene bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) sehingga diharapkan hasil amplifikasi murni gen Bax. Metode *threshold cycle* digunakan untuk menganalisa ekspresi gen, selain itu sistem mesin telah dilengkapi dengan kalibrator dye ROX sebagai *internal quality control* pada setiap reaksi.

#### 4. Pewarnaan Hoechst dan Proidium Iodide (PI)

ICM pasca *thawing* dan 3 jam, 2 hari (48 jam), dan 7 hari (168 jam) kultur dicuci dengan PBS 2x, teteskan Hoechst dan PI selama 5 menit cuci kembali dengan PBS 2x. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop inverted.

#### 5. Analisis data

Data CT<sub>v</sub> dan persentase viabilitas ICM dianalisis menggunakan friedman dan *annova one way* dengan SPSS 15.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara kuantitatif ekspresi mRNA gen Bax yang diperoleh pada 3 jam setelah kultur dan hari kedua kultur pada kedua kelompok menunjukkan level *cycle threshold value* (CT<sub>v</sub>) yang sama (Gambar 1). Pada hari ke 7 kultur koloni primer ESC yang diperoleh dari ICM vitrifikasi menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA gen Bax ( $p > 0,05$ ). Hasil yang

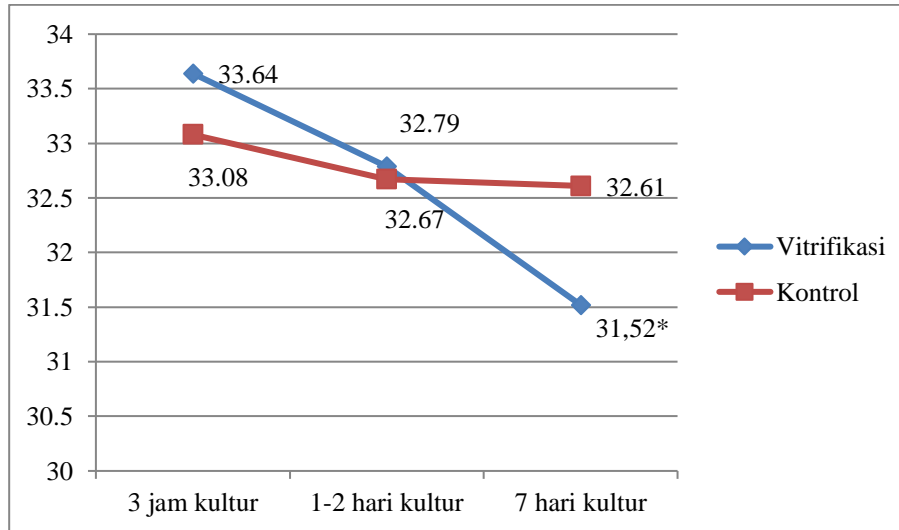
menarik pada penelitian ini adalah ekspresi mRNA gen Bax yang tidak beda pada kultur 3 jam sampai 24 jam, namun menunjukkan peningkatan pada kultur hari ke 7 untuk ICM vitrifikasi (Gambar 1). Ini menunjukkan bahwa proses vitrifikasi ICM tidak menyebabkan peningkatan gen Bax yang berperan dalam proapoptosis. Persentase viabilitas pada ICM vitrifikasi yang lebih rendah ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kontrol tetap menunjukkan adanya kematian sel pasca vitrifikasi.

Desai *et al.* (2011) yang pertama kali melaporkan penggunaan metode vitrifikasi pada ICM tidak melaporkan tentang kematian sel/apoptosis. Desai *et al.* (2011) melaporkan bahwa pasca vitrifikasi ICM dapat berkembang menjadi ESC yang memiliki sifat pluripoten. Namun penelitian lain yang menggunakan metode vitrifikasi pada embrio melaporkan adanya proses apoptosis dengan ciri-ciri munculnya fragmentasi DNA (Najafzadeh *et al.*, 2021; Inaba *et al.*, 2016). Beberapa penelitian juga melaporkan pada *spermatogonial stem cell*, *mesenchymal stem cell* (MSC) dan *haematopoietic stem cell* yang mengalami peningkatan ROS dan *caspase pathway* pasca vitrifikasi (Bissoyi A. & Pramanik K, 2014; Jung *et al.*, 2021; Desoutter *et al.*, 2019). Viabilitas sel, *purity* dan *microbial testing* merupakan prinsip dasar dalam *stem cell banking* (Sun *et al.*, 2016) sehingga konsentrasi krioprotektan yang tepat menjadi penting. Krioprotektan dapat melindungi sel dengan menggantikan komposisi air di dalam sel sehingga saat pembekuan tidak terbentuk kristal es yang dapat merusak membran sel, namun tingginya konsentrasi krioprotektan dapat berefek toksik pada sel (Berejnov *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2020).

Apoptosis adalah *program cell death* yang secara alami akan berlangsung selama perkembangan dan proses penuaan makhluk hidup dengan tujuan untuk hemostasis, respon stres atau kerusakan DNA, pertumbuhan, adanya infeksi sel dan regulasi sistem imun (Wulandari E., 2011). Pada metode vitrifikasi penambahan krioprotektan dan perubahan

suhu saat *thawing* dapat menyebabkan peningkatan ROS dan fragmentasi DNA yang memicu apoptosis. Beberapa penelitian melaporkan bahwa dengan menambahkan suplemen seperti pan-caspase, calpain

inhibitor dan Y-27632 pada krioprotektan dapat menghambat terjadinya apoptosis sel saat kriopreservasi (Ichikawa *et al.*, 2012; Bissoyi A. & Pramanik K, 2014).



Gambar 1. Nilai *cycle threshold value* (CTv) dari ekspresi mRNA gen Bax ICM dan koloni primer ESC (Friedman,  $p < 0,05$ )

Pada Tabel 1 terlihat bahwa persentase viabilitas ICM vitrifikasi pada kultur 3 jam, hari ke 2 maupun hari ke 7 lebih rendah dibandingkan dengan ICM kontrol ( $p < 0,05$ ).

Namun viabilitas koloni primer ESC hari ke 7 kultur pada ICM vitrifikasi menunjukkan persentase yang tinggi dibandingkan 3 jam setelah kultur.

Tabel 1. Persentase viabilitas ICM dan koloni primer ESC

	Waktu	Profil Sel			Viabilitas (%) (means $\pm$ SD)
		Total sel	Hidup	Mati	
Kontrol	3 jam	81	74	7	91,00 $\pm$ 5,48
	2 hari	361	347	14	94,75 $\pm$ 3,09
	7 hari	5869	5822	47	98,75 $\pm$ 0,10
Vitrifikasi	3 jam	82	69	13	83,75 $\pm$ 4,35*
	2 hari	245	226	19	92,00 $\pm$ 2,45*
	7 hari	1678	1628	50	97,00 $\pm$ 0,82*

tanda (\*) menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan kontrol dengan uji Anova  $p < 0,05$

Pada penelitian ini ekspresi mRNA menunjukkan peningkatan pada hari ke 7 kultur pada ICM vitrifikasi tetapi viabilitas koloni ESC meningkat dibandingkan kultur 3 jam dan 2 hari (Tabel 1). Hal ini terjadi karena lama kultur dan kondisi kultur pada ICM vitrifikasi yang kurang optimal dapat menghambat proses *recovery* sel sehingga sel

yang rusak mengalami kematian melewati jalur apoptosis. Kondisi kultur yang optimal juga dapat digunakan untuk menghambat proses apoptosis seperti penambahan plasma dan antioksidan saat kultur *stem cell* pasca kriopreservasi (Díez *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2021) dan untuk meningkatkan proliferasi pemberian *growth factor*, pemberian oksigen



hingga pembuatan bioreaktor tridimensi untuk *mimicking* dari *stem cell niche* (Sanden *et al.*, 2010).

## KESIMPULAN

Metode vitrifikasi dapat digunakan untuk simpan beku ICM mencit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Berejnov, V., Husseini, N. S., Alsaied, O. A., & Thorne, R. E. 2006. Effects of cryoprotectant concentration and cooling rate on vitrification of aqueous solutions. *Journal of Applied Crystallography*. vol. 39(2): 244–251. <https://doi.org/10.1107/S0021889806004717>.
- Bissoyi A. & Pramanik K. 2014. Role of the apoptosis pathway in cryopreservation-induced from umbilical cord blood. *Bioreservation and Biobanking*. vol. 12(4): 246–254. <https://doi.org/10.1089/bio.2014.0005>.
- Desoutter, J., Ossart, C., Lacassagne, M. N., Regnier, A., Marolleau, J. P., Harrivel, & Veronique. 2019. Cryopreservation and thawing of hematopoietic stem cell CD34-induced apoptosis through caspase pathway activation: Key role of granulocytes. *Cytotherapy*. 21(6): 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.04.004>.
- Díez, J. M., Bauman, E., Gajardo, R., & Jorquera, J. I. 2015. Culture of human mesenchymal stem cells using a candidate pharmaceutical grade xeno-free cell culture supplement derived from industrial human plasma pools. *Stem Cell Research and Therapy*. vol. 6(1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0016-2>.
- Fan, B. S., Liu, Y., Zhang, J. Y., Chen, Y. R., Yang, M., & Yu, J. K. 2021. Principles for establishment of the stem cell bank and its applications on management of sports injuries. *Stem Cell Research and Therapy*. vol. 12(1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02360-3>.
- Ichikawa, H., Nakata, N., Abo, Y., Shirasawa, S., Yokoyama, T., Yoshie, S., ... Sasaki, K. 2012. Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cells. *Cryobiology*. vol. 64(1): 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.11.005>.
- Inaba, Y., Miyashita, S., Somfai, T., Geshi, M., Matoba, S., Dochi, O., & Nagai, T. 2016. Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. *Cryobiology*. vol. 72(2): 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.006>.
- Jeong, Y. H., Kim, U., Lee, S. G., Ryu, B., Kim, J., Igor, A., ... Kim, C. Y. 2020. Vitrification for cryopreservation of 2D and 3D stem cells culture using high concentration of cryoprotective agents. *BMC Biotechnology*. vol. 20(1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00636-9>.
- Jung, S., Oh, H., Ahn, J., Kim, Y., Kim, B., & Ryu, B. 2021. Antioxidant or apoptosis inhibitor supplementation in culture media improves post-thaw recovery of murine spermatogonial stem cells. *Antioxidants*. vol. 10(754): 1–14.
- Madden, D. T., Davila-Kruger, D., Melov, S., & Bredesen, D. E. 2011. Human embryonic stem cells express elevated levels of multiple Pro-Apoptotic BCL-2 family members. *PLoS ONE*. vol. 6(12): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028530>.
- Najafzadeh, V., Bojsen-Møller Secher, J., Pihl, M., Ærenlund, A., Jørgensen, N., Jensen, K. K., ... Hyttel, P. 2021. Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts. *Theriogenology*. vol. 171: 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.020>.
- Rinendyaputri, R., & Boediono, D. A. 2013. Perkembangan koloni primer embryonic stem cell (ESC) mencit pasca vitrifikasi inner cell mass (ICM) development of primary murine embryonic stem cell (ESC) colonies post-vitrified inner cell mass (ICM). *Buletin Penelitian Kesehatan*. vol. 41(3): 171–178.
- Sun, C., Yue, J., He, N., Liu, Y., Zhang, X., & Zhang, Y. 2016. Fundamental principles of stem cell banking. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol. 951: 31–45. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_3).
- Van Der Sanden, B., Dhobb, M., Berger, F., & Wion, D. 2010. Optimizing stem cell culture. *Journal of Cellular Biochemistry*. vol. 111(4): 801–807. <https://doi.org/10.1002/jcb.22847>.
- Wobus, A. M., & Löser, P. 2011. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Archives of Toxicology*. vol. 85(2): 79–117. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0641-6>.
- Wulandari E. 2011. Apoptosis protein yang terlibat dan perannya dalam sel normal. *Medika Islamika*. vol. 6(1): 52–62.