

KULTUR SEL *BABY HAMSTER KIDNEY* (BHK) MENGGUNAKAN MEDIA *DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM* (DMEM)

Mashita Andiana^{*1}, Yuanita Rachmawati, M.Sc.², Drh.Sri Susila Andayani³

¹Mahasiswa Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya,

²Dosen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya,

³Dokter Hewan Pusat Veteriner Farma Surabaya

*Email : mashitaandiana1305@gmail.com

ABSTRAK

Kultur sel merupakan suatu proses saat sel hidup ditempatkan ke dalam suatu media yang dapat membuat sel tersebut berkembang biak atau tumbuh secara in vitro, Kultur sel dapat berupa kultur sel primer maupun cell line, Metode dalam kultur sel terdiri atas kultur monolayer dan kultur suspensi. Pembuatan media kultur untuk pertumbuhan sel diusahakan memenuhi kriteria. Konstituen dasar dari media kultur yang paling banyak digunakan adalah BSS (*Balanced Sald Solution*). Untuk mendapatkan pertumbuhan sel yang optimal, media kultur ditambahkan serum. Serum yang biasa digunakan dalam kultur adalah serum anak sapi (*calf serum*), serum fetus sapi (*foetal bovine serum*), serum kuda dan serum manusia. Perhitungan sel menggunakan counting chamber. Metode yang digunakan adalah revival kemudian split sel, stor sel dan menghitung sel. Hasil revival jumlah sel tertinggi didapat dari botol nomer 3 dengan jumlah sel 310 yaitu botol dengan sel BHK label tahun 2016, dan hasil split sel yang paling tinggi juga didapat dari botol kultur nomer 3 dengan jumlah sel 345 dan 311.

Kata Kunci: Kultur sel, BHK, Counting Chamber

PENDAHULUAN

Kultur sel merupakan suatu proses saat sel hidup ditempatkan ke dalam suatu media yang dapat membuat sel tersebut berkembang biak atau tumbuh secara in vitro (Ma'at, 2011). Media kultur buatan yang digunakan untuk menumbuhkan sel di luar tubuh organisme dibuat semirip mungkin dengan cairan biologis pada saat sel berada dalam tubuh organisme (Echalier, 1997). Kultur sel dapat

berupa kultur sel primer maupun cell line. Kultur sel primer merupakan kultur yang dimulai dari sel, jaringan, organ yang diperoleh langsung dari organisme asalnya, sedangkan cell line ialah kultur yang diperoleh dari subkultur pertama dari kultur primer. Kultur sel primer memiliki beberapa kelemahan di antaranya kebutuhan hewan percobaan sebagai bahan baku kultur yang besar dan kemungkinan besar adanya kontaminasi virus atau

mikroba yang dapat menginfeksi hewan percobaan yang akan digunakan sebagai stok kultur (Ma'at, 2011).

Keterbatasan teknik kultur sel antara lain dalam pembuatan kultur sel memerlukan keahlian dan keterampilan khusus yang menjamin bahwa seluruh mata rantai prosedur pembuatannya terkontrol secara aseptis (Freshney, 2005).

Metode dalam kultur sel terdiri atas kultur monolayer dan kultur suspensi. Metode kultur monolayer digunakan jika sel yang akan dikultur merupakan sel yang melekat, sedangkan metode kultur suspensi digunakan untuk sel yang tidak melekat (Ma'at, 2011). Prinsip umum maupun metode yang digunakan dalam kultur sel invertebrata, relatif sama dengan prinsip maupun metode kultur yang digunakan dalam kultur sel vertebrata (Vlak *et al.*, 1996).

Sebelum tahun 1960, media kultur yang berasal dari alam/ natural masih banyak digunakan, seperti: cairan amniotik, ekstrak embrio dan cairan yang berasal dari berbagai jaringan tubuh. Karena kesulitan dalam standarisasi akhirnya media tersebut banyak ditinggalkan dan yang masih banyak digunakan hingga saat ini tinggal serum, *tryptose phosphate broth* dan

laktalbumin hidroksilat yang diperoleh dari hidrolisis enzimatis protein susu, itupun kebanyakan digunakan dalam campuran bersama media culture (defined media) guna meningkatkan sifat-sifat pertumbuhannya.

Pembuatan media kultur untuk pertumbuhan sel diusahakan memenuhi kriteria. Konstituen dasar dari media kultur yang paling banyak digunakan adalah BSS (*Balanced Sald Solution*) yang disusun dari garam anorganik, natrium bikarbonat dan suplemen glukosa. Untuk membuat media kultur yang kompleks, misalnya medium Eagle MEM (*Minimum Essential Medium*) diperlukan penambahan bahan-bahan seperti asam amino, vitamin, dan mineral.

Berikut adalah macam-macam media yang digunakan dalam kultur sel : **Minimun Essential Media (MEM)** Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) medium kultur yang dikembangkan oleh Harry Eagle, yang mengandung asam amino , garam, glukosa dan vitamin, salah satu variasi dari EMEM yaitu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) yang mengandung vitamin dan asam amino 4 kali lebih besar dan mengandung 2-4 kali lebih banyak glukosa dan terdapat tambahan unsur besi dan phenol red

(Ma'at, 2011). Media *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) memiliki konsentrasi asam amino 2 kali lebih tinggi dari media Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Mather dan Roberts, 1998). Media Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) merupakan media yang banyak digunakan untuk kultur vertebrata, media RPMI 1640 memiliki variasi jumlah asam amino yang hampir sama dengan Grace's, tetapi memiliki konsentrasi asam amino yang lebih kecil dibanding Grace's (Mather dan Roberts, 1998).

Basal Medium Eagle (BME)

Media ini dikembangkan oleh Harry Eagle, dan merupakan salah satu medium kultur sintetik yang banyak digunakan untuk mengkultur sel. Ada beberapa medium basal yang dikembangkan oleh Eagle dengan sedikit perbedaan dikomposisinya. Media ini digunakan untuk menunjang pertumbuhan sel HeLa.

McCoy's 5A Medium pada awalnya diformulasikan untuk menumbuhkan sel hepatoma Novikoff dan ternyata juga baik untuk menumbuhkan dan merangsang proliferasi sel karsinoma Walker 256 termasuk juga sel yang mengalami transformasi ataupun sel normal tikus

atau manusia. Media ini meliputi tambahan level inositol dan glukosa serta mengandung L-glutamin.

Medium 199 sering digunakan dalam produksi vaksin, virologi dan kultur dari berbagai tipe sel "*Non transformed*". Untuk pemakaian jangka panjang di anjurkan untuk penambahan suplemen serum. Formula medium 199 mengandung garam Earle's dan L-glutamin dan tidak mengandung natrium bikarbonat.

Media Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 banyak digunakan untuk kultur sel dan kultur jaringan, secara tradisional digunakan untuk kultur sel-sel limfoid. Medium RPMI mengandung fosfat dalam jumlah besar dan diformulasi untuk digunakan dalam lingkungan atmosfer dengan 5% CO₂ dan digunakan dalam bentuk bebas serum untuk pertumbuhan sel limfoid.

Untuk mendapatkan pertumbuhan sel yang optimal, media kultur ditambahkan serum. Serum yang biasa digunakan dalam kultur adalah serum anak sapi (*calf serum*), serum fetus sapi (*foetal bovine serum*), serum kuda dan serum manusia. Namun yang paling sering digunakan adalah calf serum dan foetal bovine serum. Produsen serum mensyaratkan asal atau sumber hewan yang diambil

serumnya harus berasal dari daerah yang bebas dari penyakit tertentu, misalnya virus mulut dan kuku.

Counting chamber merupakan suatu kaca obyek tebal, di atasnya diasahkan suatu dataran yang dalamnya 0,1 mm. Pada dataran ini di buat garis-garis berbentuk 16 persegi besar, pada setiap persegi besar di bagi lagi menjadi 16 persegi kecil. Panjang sisi persegi kecil 0,05 mm. Jika di atas bagian yang diasah ini di letakan sebuah kaca tutup, maka terbentuk suatu ruang yang tingginya adalah 0,1 mm.

METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pengujian Mutu dan Pengembangan Produk (PMPP) Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) Surabaya. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah alat bedah, botol kultur, pipet ukur, cawan petri, labu tripsinizing, magnetic stirrer, centrifuge, inkubator. Dan bahan yang digunakan adalah hamster usia 4-8 minggu, tripsin 0.2%, hank's BSS, media tumbuh (15% fetal bovine serum + eagle).

Preparasi Kultur Primer BHK

Pertama hamster di anesthesi kemudian vena jugularisnya dipotong dan dikeluarkan darahnya, lalu hamster

disayat dan diambil ginjalnya. Kemudian ginjalnya ditempatkan pada cawan petri yang mengandung Hank's BSS fascia dan jaringan ikat dibuang kemudian dipotong menjadi 4 bagian dan ditempatkan di gelas kecil dan dicuci beberapa kali dengan Hank's BSS dan dicincang. Kemudian cincangan ginjal dimasukan ke labu tripsinizing dan dibilas dengan Hank's BSS dan ditambah tripsin, kemudian ditempatkan di magnetic stirer lalu dibuang supernatannya, disaring kedalam tabung centrifuge dan ditambahkan media pertumbuhan, lalu disentrifugasi dibuang supernatannya lalu dicuci dengan Hank's BSS dan kembali disentrifugasi. Resuspen sel dimedia pertumbuhan dan diencerkan dengan kristal violet kemudian dihitung sel hidup dan ditempatkan kedalam wadah inkubasi, diinkubasi dan diperiksa keadaan selnya.

Preparasi Suspensi Kultur BHK

Media dari tiap botol kultur dituang kemudian dicuci dengan PBS 2 sampai 3x lalu ditambahkan tripsin dan diinkubasi. Kemudian tripsin dibuang dari botol kultur dan ditambah media yang baru lalu dikocok dan diamati.

Revival

Sel yang disimpan pada suhu - 80°C dicairkan dengan cara di inkubasi

pada suhu 37°C, setelah mencair sel di sentrifuge selama 10 menit kemudian supernatan dibuang dan sel ditambahkan dengan media DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) + FBS (Fetal Bovine Serum) dan di masukan ke dalam botol kultur (total sel + media kultur adalah 8-10 ml). Sel + media disimpan pada suhu 37°C dan dilakukan pengamatan setiap harinya.

Split Sel (Memperbanyak Sel)

Sel di ambil dari inkubator suhu 37°C kemudian dilakukan split dengan cara : media dibuang kemudian dicuci dengan PBS 2-3 kali, setelah itu botol diberi firsen tripsin dan dikocok pelan. Kemudian seluruh cairan dari botol kultur di sedot dengan menggunakan pipet dan di bagi kedalam 2 botol kultur . Lalu masing-masing botol kultur di beri media dan di pelihara pada suhu 37°C. Media diganti setiap 2-3 hari sekali.

Stor Sel

Prepare media Stor. Pelarut DMSO + FBS di dinginkan dikulkas, setelah dingin media dibuang kemudian dicuci dengan PBS, lalu di tambah firsen tripsin dan dikocok pelan. Kemudian botol ditambah media dan disentrifuge. Supernatan dibuang lalu endapan diberi media kemudian dimasukan ke vial-vial dan di dinginkan, setelah 24 jam dipindahkan ke suhu -80°C.

Hitung Sel

Sel didalam botol kultur diambil dari suhu -20°C kemudian di hangatkan pada suhu 37°C, setelah sel mencair sel di ambil dengan menggunakan pipet tetes lalu di teteskan pada objek glass lalu ditetesi dengan pewarna untuk memudahkan perhitungan sel, kemudian sel + pewarna di teteskan pada Counting chamber dan dilakukan perhitungan dibawah mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian disajikan dalam tabel

Tabel 1. Jumlah Sel Hidup pada Tiap Botol Kultur

Nomer Botol	Jumlah
Botol 1 (2014)	310
Botol 2 (2015)	297
Botol 3 (2016)	325

Tabel 2. Perbandingan Jumlah Sel Tiap Botol Setelah di Split dan Diinkubasi

Botol 1 (2014)	a. 301
	b. 275
Botol 2 (2015)	a. 326
	b. 210
Botol 3 (2016)	a. 345
	b. 311

Berdasarkan tabel 1 dapat diketahui bahwa botol kultur 1 yang tercatat adalah sel BHK yang dikultur dari tahun

2014 jumlah selnya terhitung 310 sedangkan botol kultur 2 tahun 2015 terhitung jumlah sel hidupnya sebanyak 297 dan botol 3 tahun 2016 jumlah sel yang terhitung sebanyak 311. Jumlah sel yang didapat adalah jumlah sel yang dihitung dari satu counting chamber. Dapat dilihat bahwa Sel BHK yang dikultur sejak tahun 2014 dan diamati kembali pada awal tahun 2017 masih menunjukkan jumlah sel yang sama dengan sel yang baru dikultur . Setelah itu tiap botol kultur displit menjadi 2 dan diinkubasi selama 3 hari kemudian dihitung kembali jumlah selnya, dan didapatkan hasil yang dijelaskan pada Tabel 2. Dan dapat dilihat bahwa hasil yang didapat pada botol 1(a) jumlah selnya adalah 301 dan pada botol 1(b) sebanyak 275 sel, kemudian pada botol 2 (a) jumlah selnya lebih banyak yakni 326 dan botol 2(b) sebanyak 210 saja. Dapat dilihat pada tabel bahwa botol 3(a) adalah botol dengan jumlah sel yang paling besar yakni 345 sedangkan botol 3(b) 311 sel. Perbedaan jumlah sel tidak signifikan seperti pada saat sel sebelum displit.

Persiapan hamster

hamster di anesthesi untuk mempermudah proses pembedahan. Kemudian bagian vena jugularis (pembuluh darah dileher) dipotong dan

dikeluarkan darahnya. Lalu hamster di bedah dan di ambil organ ginjalnya, ginjal diambil dari hamster dengan usia tidak lebih dari 4-8 minggu. Kemudian ginjal dibersihkan jaringan ikat dan fascianya lalu ditempatkan pada cawan petri yang mengandung Hank's BSS, Hank's BSS adalah larutan garam standar yang banyak digunakan dalam penelitian biomedis untuk mendukung pertumbuhan berbagai jenis sel. Larutan ini adalah non-toksik, melainkan biokompatibel dengan sel ligamen periodontal, pH seimbang sebesar 7,2 dan memiliki osmolalitas 320 mOsm/kg. Lalu ginjal di potong menjadi 4 bagian untuk mempermudah proses pencincangan, kemudian ginjal dicuci dengan menggunakan Hank's BSS lalu dicincang sampai ukurannya kurang lebih 1 mm. Cincangan ginjal dimasukkan kedalam labu tripsinizing dan dibilas dengan Hank's BSS sebanyak 20 ml , setelah itu tripsin 0.2% dimasukan kedalam labu sebanyak 5 ml/ginjal dan di tempatkan di magnetic stirrer pada suhu ruang selama 10 menit. Kemudian setelah di stirrer supernatan dari jaringan dibuang. Kemudian tambahkan kembali tripsin 0.2% sebanyak 5ml/ginjal dan ditempatkan di magnetic stirrer dengan suhu 4°C selama satu malam. Kemudian

hari berikutnya saring suspensi ke dalam tabung centrifuge lalu tambahkan media pertumbuhan (DMEM) dan lakukan sentrifugasi 65X g selama 10 menit, setelah selesai sentrifugasi buang supernatan. Kemudian cuci dengan menggunakan Hank's BSS sebanyak 3 kali dan lakukan sentrifugasi kembali selama 10 menit. Kemudian resuspen sel pada media pertumbuhan lalu encerkan suspensi dengan kristal violet, penambahan kristal violet untuk pewarnaan pusa sel. Lalu amati dan hitung sel dengan nukleus dan sitoplasma penuh. Kemudian tempatkan kedalam wadah dan inkubasi sel pada suhu 37°C, amati pertumbuhannya dan ganti medianya selama 3-4 hari sekali.

Revival

Hal yang pertama dilakukan adalah sel di sentrifuge selama 10 menit kemudian supernatan dibuang dan sel ditambahkan dengan media DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) + FBS (Fetal Bovine Serum) dan di masukan ke dalam botol kultur (total sel + media kultur adalah 8-10 ml). Sel + media disimpan pada suhu 37°C dan dilakukan pengamatan setiap harinya.

Pada proses pengamatan, apabila dilihat sel sudah menempel pada botol kultur, maka media harus diganti dengan yang baru. Penggantian media dilakukan

dengan tahap : media lama dibuang kemudian botol dicuci dengan PBS (Phosphate-buffered saline) 2-3 kali, kemudian botol diberi firsen tripsin yang digunakan sebagai pelepas sel dari dinding botol kultur. Setelah itu botol dituangi media baru kemudian di kocok dengan menggunakan pipet. Setelah tercampur sel + media kemudian diamati dibawah mikroskop.

Split Sel

Selain penggantian media, sel juga diperbanyak (split sel) , langkah melakukan split sel yang pertama adalah ,sel di ambil dari inkubator suhu 37°C kemudian dilakukan split dengan cara : media dibuang kemudian dicuci dengan PBS 2-3 kali, setelah itu botol diberi firsen tripsin dan dikocok pelan supaya seluruh sel terlepas dari dinding botol kultur. Kemudian seluruh cairan dari botol kultur di sedot dengan menggunakan pipet dan di bagi kedalam 2 botol kultur dengan takaran yang sama. Lalu masing-masing botol kultur di beri media dan di pelihara pada suhu 37°C. Media diganti setiap 2-3 hari sekali.

Stor Sel

Langkah-langkah stor sel yang pertama adalah, Prepare media Stor. Pelarut DMSO + FBS 1 : 9 di dinginkan dikulkas, setelah dingin media dibuang

kemudian dicuci dengan PBS 2-3 kali, lalu di tambah firsen tripsin dan dikocok pelan agar sel dapat terlepas dari botol kultur. Kemudian botol ditambah media dan disentrifuge. Supernatan dibuang lalu endapan diberi media kemudian dimasukan ke vial-vial dan di dinginkan pada suhu -20°C, setelah 24 jam dipindahkan ke suhu -80°C.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil perhitungan sel yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa hasil revival jumlah sel tertinggi didapat dari botol nomer 3 yaitu botol dengan sel BHK label tahun 2016, dan hasil split sel yang paling tinggi juga didapat dari botol kultur nomer 3.

DAFTAR PUSTAKA

- Djuwita I. *Biologi kultur jaringan*. Dalam Pelatihan Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia. FKH IPB, 2003.
- Echalier G, 1997. *Drosophila Cell in Culture*. New York: Academic Press.
- Goosen MFA, Daugulis AJ, & Faulkner, 1993. *Insect Cell Culture Engineering*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Invitrogen. 2009. *DMEM dulbecco's modified eagle media*

Ma'at, Suprpto. 2011. *Teknik Dasar Kultur Sel*. Surabaya: Airlangga University Press

Mather JP, Roberts PE, 1998. *Introduction to Cell and Tissue Culture Theory and Technique*. New York: Plenum Press

Priosoeryanto BP. *Penggunaan teknik biakan sel dalam berbagai pengujian di bidang biomedis*. Dalam Pelatihan Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia. FKH IPB, 2003.

Vlak, J.M, Gooijer CD de, Tramper J, & Miltenburger HG, 1996. *Insect Cell Culture Fundamental and Applied Aspect*. USA: Kluwer Academic Publishers