

Pemisahan Sel Mononukleus dan Kultur Sel untuk Analisis Kromosom

Donna Mesina Rosadini Pasaribu

Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Krida Wacana
 Alamat Korespondensi Jl.Arjuna Utara No.6 Jakarta Barat 11510
 mesinapasaribu@yahoo.co.id

Abstrak:

Sel-sel dalam sistem imun berasal dari sel induk pluripoten yang kemudian berdiferensiasi melalui jalur limfoid membentuk limfosit dan jalur myeloid membentuk sel-sel fagosit seperti monosit, makrofag, netrofil. Penelitian tentang kromosom manusia dapat dilakukan pada sel limfosit darah perifer. Dalam percobaan ini dilakukan pemisahan populasi sel Mononukleus (PMN) yaitu limfosit, monosit atau makrofag dengan larutan Ficoll, kemudian dilakukan kultur limfosit untuk mengamati kromosom tahap metafase. Hasil percobaan ditemukan sejumlah 400.000 sel mononukleus/mL darah. Pengamatan mikroskopik memperlihatkan kromosom pada tahap metafase, dapat diamati bila ada kelainan kromosom, jumlah (hipodiplod, diperdiploid) maupun struktur kromosom (pseudodiplid, seperti delesi, translokasi, duplikasi, inversi, kromosom iso, kromosom cincin). Disimpulkan bahwa populasi sel Mononukleus dapat dipisahkan berdasarkan sifat kimia yaitu adhesi (monosit atau makrofag) dan non adhesi (limfosit). Analisis dan pengamatan kromosom yang terbaik dilakukan pada tahap metafase. Kelainan-kelainan kromosom dapat diidentifikasi melalui biakan (kultur) limfosit darah perifer dan informasi genetika dapat diperoleh dari sel limfosit.

Kata Kunci: Pemisahan Sel Mononukleus, Ficoll, Kromosom Metafase.

Abstract:

The cells in the immune system derived from pluripotent stem cells that then differentiate to form lymphocytes through lymphoid and myeloid lines forming phagocytic cells such as monocytes, macrophages, neutrophils. Research on human chromosomes can be performed on peripheral blood lymphocytes. In this research separation at the populations cell Mononukleus (PMN), was done namely lymphocytes, monocytes or macrophages with Ficoll solution, then carried lymphocyte culture to observe the stages of metaphase chromosomes. Results showed the number of cells per mL of blood was mononukleus 400,000 cells / mL. Microscopic observations showed chromosomes in metaphase stage, can be observed when there are chromosomal abnormalities, the number (hipodiplod, diperdiploid) and chromosome structure (pseudodiplid, such as deletions, translocations, duplications, inversions, iso chromosomes, ring chromosomes). It can be concluded that in this experiment that Mononukleus cell populations can be separated based on the chemical properties of adhesion (monocytes or macrophages) and non-adhesion (lymphocytes). Best chromosome analysis and observations made at the metaphase stage. Chromosomal abnormalities can be identified through culture (culture) of peripheral blood lymphocytes and genetic information can be obtained from lymphocytes.

Keywords: Separation Mononukleus Cells, Ficoll, Metaphase Chromosome.

Pendahuluan

Tubuh mempunyai mekanisme sistem imun sebagai perlindungan dan pertahanan terhadap bahan patogen atau benda asing, yaitu sistem imun nonspesifik dan sistem imun spesifik. Sistem imun nonspesifik adalah imunitas bawaan (*innate immunity*) yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, sedangkan sistem imun spesifik (*adaptive/acquired*) merupakan sistem imun yang timbul akibat adanya benda asing yang sudah dikenal sebelumnya.

Sel-sel dalam sistem imun berasal dari sel induk pluripoten yang kemudian berdiferensiasi melalui dua jalur yaitu jalur limfoid yang membentuk limfosit dan jalur myeloid yang membentuk sel-sel fagosit seperti monosit, makrofag, netrofil.¹ Sel-sel tersebut tersebar di dalam darah, limfa, timus, kelenjar limfe, saluran nafas, saluran cerna dan saluran kemih.²

Menurut fungsinya sel sistem imun dibagi menjadi:

- Sel-sel imun nonspesifik yaitu: sel fagosit seperti mononukleus (monosit dan makrofag) dan polimorfonukleus (PMN) atau granulosit (eosinofil, neutrofil); sel natural killer (NK); sel mediator (basofil dan mastosit).
- Sel-sel sistem imun spesifik yaitu limfosit T dan B

Fagosit Mononukleus

Sel mononukleus berasal dari sel induk sumsum tulang dan mempunyai dua fungsi yaitu, sebagai fagosit profesional dengan fungsi utamanya menghancurkan antigen dan sebagai Antigen Presenting Cells (APC) yang fungsinya menyajikan antigen kepada limfosit.¹ Sel-sel yang termasuk ke dalam fagosit mononukleus adalah monosit dan makrofag.

Monosit dan Makrofag

Monosit merupakan sel agranulosit yang berasal dari sumsum tulang, ukuran bervariasi, diameter 9–12 μm . Inti berbentuk oval, tapal kuda atau berbentuk ginjal dengan kromatin yang kurang padat. Sitoplasma bersifat basofilik dan seringkali mengandung granula azurofilik. Waktu paruh monosit di dalam darah sekitar 12–

100 jam. Sel monosit yang matang akan menembus dinding kapiler darah, masuk ke dalam jaringan dan berdiferensiasi menjadi sel fagositik sistem makrofag.³

Makrofag berperan penting dalam sistem imun, salah satunya sebagai efektor yang menghancurkan benda asing atau mikroorganisme. Makrofag yang masa hidupnya panjang adalah limfosit. Sel limfosit berbentuk sferis yang mempunyai diameter dari 6–18 μm . Inti sferis dengan kromatin dan sedikit sitoplasma, pada sediaan hapus darah tampak sebagai lingkaran sekitar inti, bersifat basofilik dan mengandung granula-granula azurofilik.³ Limfosit T berperan dalam kekebalan seluler dan ditemukan sekitar 65–80% dari jumlah limfosit dalam sirkulasi darah sedangkan limfosit B berperan dalam kekebalan humoral tubuh dan sekitar 5–15% dari limfosit dalam darah.²

Penelitian tentang kromosom manusia dapat dilakukan pada sel limfosit darah perifer. TC Hsu dari Universitas Texas membuktikan bahwa larutan hipotonus menyebabkan sel menyerap air dan membesar, yang menyebabkan masing-masing kromosom terpisah sehingga dapat dengan mudah dibedakan. Pada tahun 1956 peneliti di Swedia secara sistematis menghitung adanya 46 kromosom dalam sel manusia, 22 pasang autosom dan 1 pasang kromosom sex, XX atau XY, sejak saat itu penemuan-penemuan teknik identifikasi kromosom mulai diterapkan dalam praktek klinik. Tahun 1959, para peneliti menemukan adanya tambahan kromosom 21 pada pasien-pasien sindrom down, kemudian diikuti dengan penemuan-penemuan kelainan sitogenetik lainnya.⁴

Tiap limfosit memiliki genotip yang diperlukan untuk membentuk satuan antibodi tertentu. Molekul antibodi tersebut tersusun pada membran sel sebagai reseptor. Masing-masing limfosit memiliki antibodi dengan spesifitas antigenik yang berbeda, sehingga secara keseluruhan tubuh memiliki antibodi dengan tingkat spesifitas yang sangat luas.¹

Sebanyak 50–60% limfosit T mampu memberikan respon terhadap stimuli dengan mitogen misalnya phytohemagglutinin (PHA) dan Concanavalin (Con A). Zat-zat ini merupakan aktifator poliklonal karena secara tidak spesifik (bukan sebagai antigen) dan menghasilkan serangkaian perubahan sel-sel yang sama seperti

reaksi antigen menempel pada reseptor permukaan sel antigen tersebut.^{1,2}

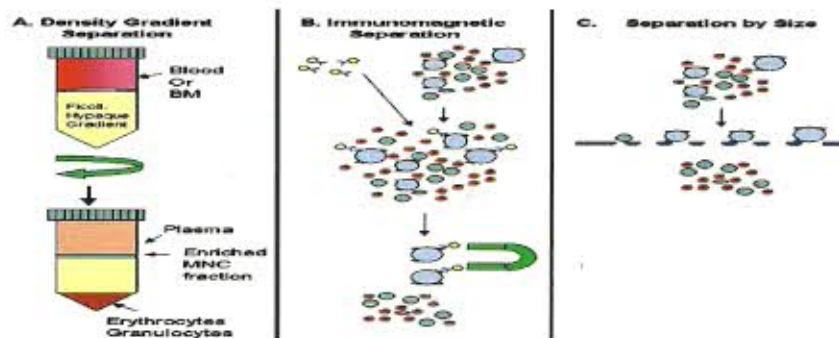
Respon terhadap mitogen tersebut dianggap menyerupai respon limfosit terhadap antigen, sehingga uji transformasi limfosit dengan rangsangan mitogen tersebut banyak dipakai untuk menguji fungsi limfosit. Stimuli limfosit dengan antigen maupun mitogen mengakibatkan berbagai reaksi biokimia di dalam sel, diantaranya fosforilasi nukleoprotein, pembentukan DNA dan RNA serta peningkatan metabolisme lemak dan lain-lain. Secara morfologik perubahan tersebut tampak sebagai sel yang menyerupai blas yaitu sel besar bersitoplasma biru dengan zone perinukleus yang terang, berinti besar dan beranak ini.²

Beberapa teknik pemisahan populasi dan subpopulasi sel telah diketahui dan pada umumnya bertujuan untuk mendapatkan subpopulasi yang diinginkan untuk diteliti. Setiap populasi sel yang terpisah dimanfaatkan sesuai dengan kebutuhan penelitian.

Untuk mengetahui kualitas sel yang dipisahkan optimal atau tidak dapat diketahui

dengan cara mengkulturkan sel tersebut secara *in vitro*, dilakukan pengamatan dan analisa karakter fungsional sel, pertumbuhan, diferensiasi sel pada setiap fase siklus sel, profil dan aktivitas kromosom. Sel mononukleus digunakan menjadi media kultur untuk mengisolasi dan menumbuhkan bakteri, virus, atau jamur yang hidup intraseluler. Penelitian menunjukkan kultur sel limfosit dimanfaatkan untuk melihat bagaimana mekanisme respon imun seluler terhadap invasi mikroorganisme di dalam sel.

Pada percobaan ini dilakukan pemisahan populasi sel mononukleus dengan menggunakan larutan ficoll yang kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 30 menit. Cara ini adalah berdasarkan daya pengendapan yang berbeda antara setiap jenis sel atau *Density-gradient separation* (Gambar 1). Hasil dari teknik tersebut adalah susunan dari sel-sel yang terpisah satu sama lain, yaitu eritrosit mengendap di dasar tabung dengan lapisan dan lapisan PMN di atasnya, lapisan ficoll, lapisan MN dan lapisan plasma.



Gambar 1. *Density-gradient Separation* dengan Ficoll.⁵

Tujuan

Percobaan ini bertujuan mendapatkan dan memisahkan populasi sel Mononukleus (PMN) yaitu limfosit, monosit atau makrofag. Mengamati kromosom dari kultur limfosit pada tahap metafase secara mikroskopik.

Metodologi Penelitian

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, pipet (mikropipet, pipet plastik),

sentrifuge dan tabung sentrifuge, inkubator, gelas berisi *beads* kaca, tabung kultur (*flask*), semprit steril 10ml, kaca objek dan cover, *improved* Naeubeuer, mikroskop, botol kultur.

Bahan-bahan yang digunakan adalah 10mL darah perifer, NaCl fisiologis, larutan Ficoll, medium ukur tanpa serum (RPMI 1640), medium kultur FCS (*Fetal Cal Serum*), trypsin EDTA, dextran 5%, darah perifer, kolkhisin, PHA (*phytohemaglutinin*), Calf serum, KCl (0,56%), larutan Carnoy, pewarna Giemsa.

a. Pemisahan Sel Mononukleus

1. Diambil 10 ml darah perifer dengan antikoagulan heparin kemudian dibagi menjadi dua bagian yaitu 8 ml untuk pemisahan sel mononukleus, 2 ml untuk kultur sel limfosit.
2. 8 ml darah dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi NaCl dengan perbandingan 1:2.
3. Darah yang telah diencerkan dialiri ke dalam tabung yang berisi ficoll. Secara perlahan-lahan sehingga darah tidak bercampur dengan larutan Ficoll.
4. Dilakukan sentrifugasi 500 g (2000 rpm) selama 20 menit.
5. Setelah sentrifugasi terlihat 4 lapisan yaitu paling bawah berupa sedimen adalah eritrosit, larutan berikutnya adalah ficoll, diatas ficoll terdapat lapisan berwarna putih kelabu seperti cincin adalah populasi sel mononukleus dan lapisan atas adalah lapisan plasma.
6. Lapisan berwarna putih kelabu seperti cincin diambil sebanyak mungkin dengan pipet tanpa terkontaminasi dengan eritrosit.
7. Jumlah populasi sel mononukleus yang diperoleh dihitung dengan menggunakan bilik hitung per ml darah.

b. Kultur Limfosit dari *Whole Blood* dengan PHA untuk Analisis Kromosom

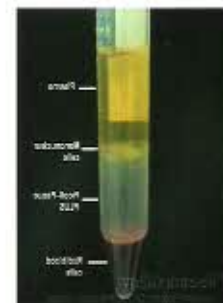
1. Dimasukkan ke dalam *flask* (tabung kultur) 5 ml RPMI, 0,8 ml Calf serum dan 60 – 120 µL PHA, setelah itu dimasukkan 0,8 ml darah. Dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ (5%) selama 72 jam, kemudian dilakukan pemanenan.
2. Kultur diputar selama 10 menit dengan kecepatan 600g (1800rpm)
3. Pellet ditambahkan dengan hipotonus (KCl 0,56 %) dan diinkubasi 20 menit, 37°C
4. Tetesi dengan larutan Carnoy, kemudian sentrifuge 10 menit

5. Larutan Carnoy diganti beberapa kali sampai larutan jernih
6. Sentrifugasi lagi dengan kecepatan 600 g, sisakan pelarutnya 0,5 – 1 mL, buatlah emulsi dari pellet bagian atas dengan pelarutnya
7. Sebar emulsi tersebut pada kaca objek, keringkan di udara terbuka
8. Beri pewarnaan Giemsa 20% selama 20 menit pada preparat tersebut. Cuci preparat dengan air kran yang mengalir dengan perlahan
9. Setelah preparat kering, diperiksa dan diamati dengan mikroskop pembesaran 40X, 100X

Hasil Penelitian

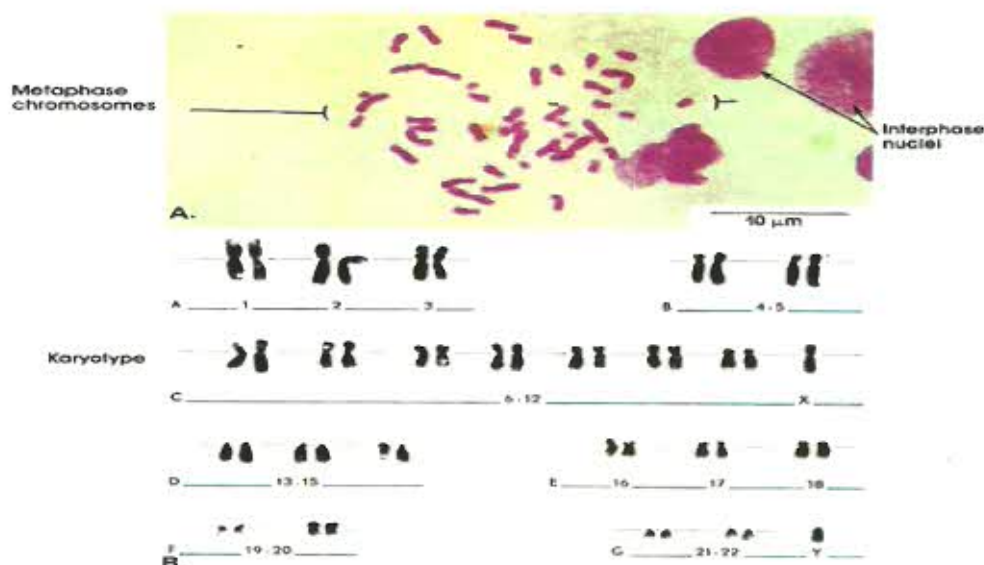
1. Pemisahan sel Mononukleus (hasil seperti gambar 2):

Jumlah sel Mononukleus = Jumlah sel x faktor koreksi
 Jumlah sel: 40 sel
 Faktor koreksi: 10000
 Jumlah sel per mL darah adalah 400.000 sel mononukleus/mL



Gambar 2. Hasil Pemisahan Sel dengan Ficoll.⁵

2. Analisis kromosom (Hasil mikroskopik seperti gambar 3):
 Pemisahan populasi limfosit dan monosit/makrofag
 Pada sediaan apus tidak terdapat sel-sel adhesi dan non adhesi



Gambar 3. Profil Aktivitas kromosom: A. Metaphase Kromosom, B. Karyotype.⁶

Pembahasan

Sel-sel mononukleus (MN) merupakan salah satu sel yang berperan dalam sistem imun yang dapat diisolasi secara invitro untuk mempelajari karakter fungsional sel, sehingga dapat dijelaskan mekanisme terjadinya penyakit pada tingkat seluler. Kemudian dipelajari karakter fungsional sel, pertumbuhan dan diferensiasi sel pada setiap fase siklus sel. Profil dan aktivitas kromosom dianalisis diamati pada tahap metafase. Sel-sel mononukleus dimanfaatkan sebagai media kultur untuk mengisolasi dan menumbuhkan bakteri, virus, atau jamur yang hidup intraseluler. Interaksi dan respon virus atau mikroorganisme didalam media kultur sel, dapat dianalisis bagaimana mekanisme sistem imun terjadi ketika mikroorganisme invasi kedalam sel.

Dari hasil percobaan perhitungan jumlah sel MN pada darah dengan menggunakan *improved Naubeur* dihasilkan sel MN sebanyak 400000MN/mL darah dan pada sediaan apus yang mempergunakan pewarnaan giemsa memperlihatkan gambaran sel-sel limfosit yang jelas dengan intinya yang padat dan dalam berbagai macam ukuran, tetapi sel-sel monosit atau makrofag tidak dijumpai pada sediaan, hal ini menunjukkan bahwa sel monosit tidak ikut terbawa.

Pada pengamatan sediaan hapus tidak memperlihatkan adanya sel adhesi maupun sel

non adhesi walaupun pada *flask* sudah terjadi pemisahan, hal ini mungkin disebabkan pada saat pencucian *flask* dari sel adhesi dan non adhesi kurang tepat sehingga tidak semua sel mengendap akibatnya pellet yang didapat sangat sedikit sekali. Selain itu teknik pembuatan sediaan hapus juga mempengaruhi pengamatan ada atau tidaknya sel-sel tersebut, sangat tergantung pada kualitas dan sediaan yang dibuat.

Untuk analisis kromosom manusia dibutuhkan sedikit darah heparin yang dibiak selama 72 jam dalam medium yang mengandung RPMI berfungsi sebagai makanan untuk sel, *calf serum* berfungsi sebagai suplai faktor pertumbuhan sel dan PHA sebagai stimulan untuk limfosit T dan juga bertindak sebagai antigen non spesifik bagi limfosit T, sehingga limfosit T akan menjadi sel blas yang muda dan berinti besar. Sel blas ini mempunyai kemampuan untuk membelah diri secara mitosis.

Permukaan Limfosit T mengandung reseptor CD4 yang berfungsi sebagai PHA reseptor. Sel T yang bereaksi dengan PHA mengalami blastokinesis menjadi blastosit kemudian blastosit bermitosis dan bila sel T berfungsi baik, maka sel T akan mengalami blastokinesis. Kultur blastokinesis secara genetik dapat melihat mitosis kultur sel (kromosom yang berkondensasi pada saat metafase).

Mitosis ini akhirnya dihentikan oleh kerja alkaloid kolkhisin pada stadium metafase, yaitu suatu stadium dimana kromosom terletak pada satu bidang ekuatorial. Sampai disini tujuan untuk mendapatkan kromosom metafase sudah tercapai.

Pemberian larutan KCl yang bersifat hipotonik dimaksudkan agar membran sitoplasma sel pecah dan kromosom tersebar. Kromosom kemudian difiksasi dengan larutan Carnoy, kemudian dibuat preparat tiup dan diwarnai dengan Geimsa, lalu diamati di bawah mikroskop cahaya.

Pengamatan di bawah mikroskop memperlihatkan kromosom yang terdapat pada tahap metafase, sehingga dapat dengan mudah diamati bila ada kelainan-kelainan kromosom, baik dalam jumlah (hipodiploid, diperdiploid) maupun struktur kromosom (pseudodiploid, seperti delesi, translokasi, duplikasi, inversi, kromosom iso, kromosom cincin). Pada percobaan ini, tidak dilakukan analisis terhadap kariotip kromosom, yang dilakukan hanya pengamatan terhadap kromosom yang diperoleh tersebut.

Kesimpulan

Sel mononukleus dapat dipisahkan dari populasi sel-sel darah dengan pemberian larutan ficoll dan disentrifugasi pada kecepatan 500g (2000rpm). Populasi sel Mononukleus dapat dipisahkan berdasarkan sifat kimia yaitu adhesi (monosit atau makrofag) dan non adhesi

(limfosit). Jumlah sel mononukleus per mL darah yaitu 400.000 sel mononukleus/mL.

Analisis atau pengamatan kromosom terbaik dilakukan pada tahap metafase. Kelainan-kelainan kromosom dapat diidentifikasi melalui biakan (kultur) limfosit darah perifer dan informasi genetika dapat diperoleh dari sel limfosit.

Daftar Pustaka

1. Roitt IM. Pokok-pokok Ilmu kekebalan , PT. Gramedia Jakarta, 1985, h.53
2. Kresno SB. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium, edisi ketiga, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, 1996,h.18
3. Junqueira LC, Carneiro J, Long JA. Basic Histology, 4th edition, Prentice Hall International Inc. 1986,h 275
4. Belanti JA. Imunologi, Gajah Mada University Press, Yogyakarta, 1993, h. 32
5. Baratawidjaja KG. Imunologi Dasar, edisi ketiga, FKUI, 1986, h.38.
6. Balic M, Nadia D, Henry L, Ram HD. Cancer metastasis: Advances in the detection and characterization of disseminated tumour cells facilitate clinical translation. The National Medical Journal of India: Volume 18. Number 5. 2005. 102p
7. Bergman RA, Adel K.A, Paul MH. Atlas of Microscopic Anatomy: Section 1 - Cells Plate 1.3: Chromosomes. Peer Review Status: Externally Peer Reviewed. 2013. 150p