

Review Artikel

## **TEKNIK PEMBUATAN KULTUR SEL PRIMER, *IMMORTAL CELL LINE* DAN *STEM CELL***

Leni Rahmawati, Irma M. Puspitasari

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21 Jatinangor 45363

Korespondensi: Leni Rahmawati, Irma M. Puspitasari | [lenirahmawati96@gmail.com](mailto:lenirahmawati96@gmail.com),  
[irma.melyani@unpad.ac.id](mailto:irma.melyani@unpad.ac.id)

### **ABSTRAK**

Dalam dunia medis, sel yang berasal dari jaringan atau organ tertentu dapat digunakan sebagai sarana untuk penelitian ataupun diagnosis suatu penyakit, misalnya pada penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus atau bakteri. Sel primer, *immortal cell line* dan *stem cell* merupakan jenis sel yang paling banyak digunakan. Teknik pembuatan sel-sel tersebut penting dipelajari untuk memudahkan para peneliti lain melakukan penelitian mendalam secara *in vitro* mengenai berbagai macam penyakit yang sulit diidentifikasi. Metode yang digunakan dalam artikel ini yaitu dengan cara penelusuran pustaka dari berbagai jurnal melalui *Pubmed Electronic Database* dan mesin pencari *Google*. Dari hasil penelusuran pustaka ini diperoleh beberapa cara pembuatan sel yaitu pembuatan sel primer lambung, *immortal cell* keratinosit dan *mesenchymal stem cell*.

Kata kunci: Sel Primer, *Immortal Cell* dan *Stem Cell*.

### **ABSTRACT**

*Cells derived from a particular tissue or organ can be used as a tool for research or diagnosis of a disease, for example, the diseases caused by viral or bacterial infection. Primary cells, immortal cells line and stem cells are the cell type that are most widely used. The technique of making such cells is important to learn to facilitate other researchers conduct in-depth studies in vitro on various diseases which are difficult to identify. The method used in this article is by literature search of various journals through Pubmed Electronic Database and Google search engine. Several procedures how to produce cell culture such as gastric primary cells, keratinocytes immortal cells and mesenchymal stem cells were obtained.*

Keyword: Primary cell, *Immortal Cell* and *Stem Cell*

### **PENDAHULUAN**

Kultur sel merupakan suatu metode yang mengacu pada pengangkatan sel dari hewan atau tumbuhan yang kemudian dikultur dalam suatu lingkungan buatan yang

sesuai [1]. Sel tersebut dapat diangkat dari jaringan secara langsung dan dipilih secara enzimatik, melalui suatu teknik yang berarti sebelum dibudidayakan, atau mungkin juga diambil dari *cell line* atau *cell stain* yang

sudah disediakan [1]. Kultur sel sudah dilakukan sejak awal tahun 20-an dan digunakan sebagai sarana belajar mengenai sel hewan secara *in vitro* [2].

Dalam dunia medis, sel yang berasal dari jaringan atau organ tertentu dapat digunakan sebagai sarana untuk penelitian ataupun diagnosis suatu penyakit, misalnya pada infeksi virus atau bakteri [2]. Penyakit yang disebabkan oleh paparan virus atau bakteri dapat menyebabkan terjadinya kanker, salah satu contohnya adalah kanker lambung yang disebabkan oleh bakteri *Helicobacter pylori* [3,4]. *Helicobacter pylori* merupakan bakteri gram negatif yang prevalensinya hampir 50% dari populasi dunia [5] dan merupakan satu-satunya bakteri yang diklasifikasikan sebagai bakteri karsinogen tipe 1 oleh WHO [6]. Mekanisme yang menunjukkan bahwa *H. pylori* dapat menginisiasi kanker lambung masih kurang dipahami, salah satu penyebabnya adalah kurangnya model hewan yang cocok sebagai hewan uji [7]. Oleh karena itu, dibutuhkan sistem sel primer untuk dapat melihat fase

awal terjadinya kanker tersebut pada sel epitel lambung yang sehat [7]. Untuk memudahkan dalam penelitian berbagai penyakit diperlukan pula sel yang tahan lama agar penelitian dengan durasi waktu yang lama tidak mengalami kendala karena sel mengalami kematian atau kerusakan pada waktu tertentu, oleh karena itu dibuat pula *immortal cell line*.

Selain beberapa hal di atas, baru-baru ini lahir terapi baru dalam bidang jaringan yang sering disebut dengan *stem cell*, terapi ini berkembang dengan cepat dalam bidangnya [8] Terapi *stem cell* telah terbukti efektif secara klinis dan berpotensi menyebabkan hasil pengobatan yang kuat untuk regenerasi jaringan [9,10]. Oleh karena itu, pengetahuan mengenai cara membuat sel induk juga sangat dibutuhkan untuk proses penelitian berbagai macam penyakit.

Dalam artikel ini, telah dirangkum bagaimana cara membuat kultur sel primer, *immortal cell line* dan *stem cell*. Perkembangan ilmu pengetahuan dan

penelitian mengenai cara pembuatan sel memudahkan para peneliti lain untuk melakukan penelitian mendalam secara *in vitro* mengenai berbagai macam penyakit yang sulit diidentifikasi jika menggunakan kultur sel biasa. Hal tersebut dapat disebabkan oleh waktu hidup sel yang hanya sebentar atau pun karena keterbatasan sel yang akan digunakan. Oleh karena itu, untuk lebih memudahkan penelusuran mengenai cara membuat sel maka dilakukan *review* terhadap beberapa jurnal tentang cara membuat kultur sel primer, *immortal cell line* dan *stem cell* dari sel hewan atau pun sel manusia.

## **METODE**

Metode yang digunakan dalam *review* artikel ini yaitu dengan cara penelusuran pustaka dari berbagai jurnal melalui internet pada mesin pencari *Google* dan *Pubmed Electronic Database* dengan kata kunci *primary cell culture, stem cell and immortal cell line review*.

## **Kriteria seleksi data (eksklusi dan inklusi)**

Dari beberapa jurnal yang telah diperoleh, dilakukan penyeleksian artikel berdasarkan pada kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditentukan. Kriteria inklusi yang digunakan ialah artikel-artikel yang di dalamnya memuat cara pembuatan sel primer, *immortal cel line* dan *stem cell*. Sedangkan untuk kriteria eksklusi yaitu jurnal yang di terbitkan dibawah tahun 2005.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **1. Metode Pembuatan Kultur Sel Primer**

#### **Isolasi Kelenjar Lambung**

Untuk cara membuat sel primer, Schlaermann *et al.*[7] menggunakan sel primer lambung sebagai contohnya[7]. Pembuatan kultur sel primer lambung ini dilakukan dengan cara mengisolasi kelenjar lambung dari jaringan perut yang sehat, kemudian ditumbuhkan pada media yang mengandung matrigel dengan berbagai factor pertumbuhan, regulator perkembangan dan inhibitor apoptosis untuk menghasilkan sel epitel lambung yang normal dan tahan lama [7].

Pembuatan sel primer lambung diawali dengan pengambilan sampel dari kelenjar lambung manusia sehat yang berasal dari klinik umum [7]. Komposisi media yang digunakan mengikuti protokol yang telah diterbitkan oleh *Clevers laboratory* [11-13]. Sampel dari kelenjar dicuci dengan *Hank's Buffer Saline Solution* (HBSS) dingin dan lemak serta jaringan ikat lainnya sudah dihilangkan. Sampel dipotong-potong sekitar 5mm, kemudian dicuci dengan HBSS sebanyak 8-10 kali sampai supernatnya bersih dan diinkubasi dengan larutan pengkelat (air suling dengan 5,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 8,0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 96,2 mM NaCl; 1,6 mM KCl; 43,4 mM sukrosa; 54,9 mM D-sorbitol; 0,5 mM DL dithiothreitol, 2 mM EDTA) selama 30 menit dengan suhu 37°C pada *shaking platform* [7]. Supernatan dipindahkan, fragmen jaringannya ditempatkan dalam cawan petri dan diperas dengan lembut menggunakan *slide* kaca untuk mengisolasi kelenjar lambung [7]. Kelenjar yang sudah diisolasi, disuspensi dalam medium yang mengandung 10% *fetal*

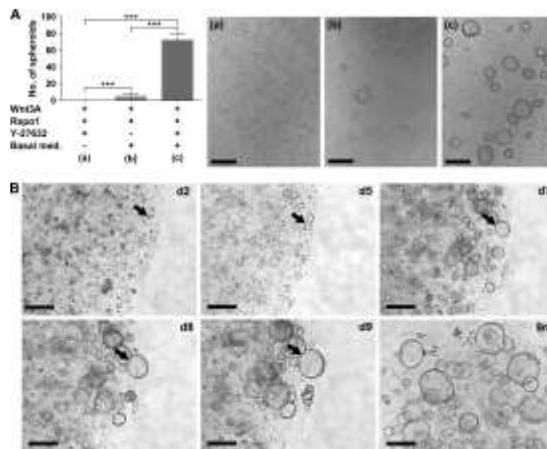
*calf serum* (FCS, *Biochrom*) disimpan dalam tabung dan dibiarkan mengendap selama 1 menit sebelum supernatan yang mengandung sebagian besar kelenjar terisolasi dipindahkan ke tabung baru [7]. Setelah lima kali dicuci, kelenjar dihitung di bawah mikroskop dan disentrifugasi selama 5 menit (250 × g) untuk kemudian dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan *Dulbecco* yang telah dimodifikasi media *Eagle/ F12* (ADF; Infitrogen) [7].

### **Kultur Kelenjar Lambung**

Kelenjar lambung disolasi dan fragmen lambung yang telah dicampur dengan *ice-cold Matrigel* (faktor pertumbuhan berkurang, bebas fenol merah; BD *Biosciences*) dan diunggulkan pada pra pemanasan *24-well plate* dari 300 kelenjar/fragmen per 40 µL Matrigel/well [7]. Matrigel dipolimerisasi selama 15 menit pada suhu 37°C dan dilapis dengan 500 µL media ekspansi hangat (ADF, 50% kondisi media Wnt3A (seperti yang dijelaskan dalam Willert et al [14], 25% kondisi media R-spondin1 yang disuplemen dengan 10 mM

4- (2-hidroksietil) -1-asam piperazine ethanesulfonic, 1% Glutamax, 2% B27, 1% N2, 20 ng/mL faktor pertumbuhan epidermal manusia (EGF) (semua Invitrogen), 150 ng/mL noggin manusia, 150 ng / mL faktor pertumbuhan fibroblast manusia (FGF)-10, 1,25 mM N-asetil-L-sistein, 10 mM nicotinamide, 10 nM gastrin manusia, 2 mM SB202190 (semua Sigma) dan 1 mM A83-01 (Calbiochem) [7]. 7,5 mM Y-27632 (Sigma) ditambahkan selama 3 hari pertama [7]. Kultur disimpan pada suhu 37°C, 5% CO2 dalam inkubator lembab [7].

pada rasio 1: 8. Untuk *passaging*, media kultur dipindahkan dan *spheroids* bersama-sama dengan Matrigel dilarutkan dalam ADF dingin. Setelah ditransfer ke 15 mL tabung Falcon baru, dilakukan pipetting *spheroids* dengan kuat (8-10 kali) dengan menggunakan pipet Pasteur [7]. Selanjutnya, *sheared spheroids* disentrifugasi selama 5 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 250×g dan pelet yang dihasilkan diinkubasi dengan TrypLE Ekspres Enzim (5 menit; 37 ° C; Invitrogen). TrypLE dinaktivasi dengan penambahan ADF dan 10% FCS, *sheared spheroids* dipelet kemudian dicuci dalam ADF dan disentrifugasi [7]. Supernatan dibuang, pelet disuspensikan dalam Matrigel dingin [7].



Gambar 1. Pembuatan kultur *spheroid* lambung manusia

### Pemeliharaan dan diferensiasi *spheroids*

Medium kultur ditukar setiap 2-4 hari dan *spheroids passaged* setiap 10-21 hari

Untuk diferensiasi *spheroids* menjadi gastroids, sel ditumbuhkan dalam medium ekspansi selama 5 hari. Diferensiasi diinduksi oleh kultur dalam media ekspansi Wnt3A-bebas dan RSPO-bebas (media diferensiasi) untuk 5 hari [7]. Untuk diferensiasi dengan menghambat *Notch signaling*, 1 mM DBZ (Calbiochem)

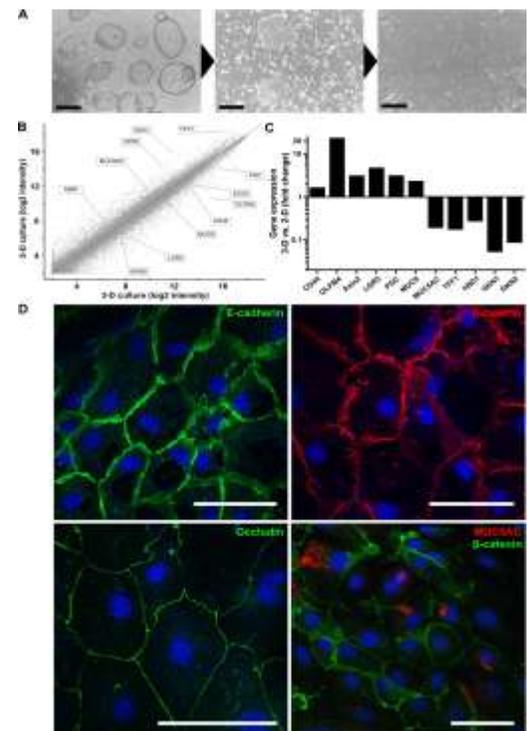
ditambahkan ke dalam media ekspansi dan kultur yang disimpan selama 5 hari di bawah kondisi ini sebelum analisis. Untuk penyimpanan jangka panjang, *spheroids* dipanen di CryoSFM dingin (1 mL per sumur, PromoCell), perlahan beku turun pada  $-80^{\circ}\text{C}$  dan ditransfer ke nitrogen cair. Untuk pemulihan, *spheroids* yang dicairkan dengan cepat, dicuci dengan ADF, pellet dan diresuspensi dalam Matrigel sebelum penyemaian seperti yang dijelaskan [7].

### Kultur Sel primer lambung dua dimensi

*Spheroid* dengan protokol yang sama seperti yang telah dijelaskan di atas digunakan untuk *passaging*, ditempatkan dalam media dua dimensi (ADF, 10% FCS, 2% B27, 1% N2, 10 mM nicotinamide, 50 ng/mL human EGF, 7,5 mM Y-27632 and 1 mM A83-01) dan diunggulkan dengan dilapisi kolagen[7]. Kultur disimpan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5% dalam inkubator lembab [7]. Untuk mikroskopik, sel yang telah diunggulkan dislip menggunakan penutup kaca berlapis kolagen [7]. Sebelum dilakukan uji mikrokoik sel dicuci dengan

*buffer* salin, dan disimpan selama satu malam pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan paraformaldehid 3,7%, dicuci tiga kali dengan PBS pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  sampai label berfluoresensi [7].

Pada pembuatan kultur sel primer lambung ini dilakukan kultur tiga dimensi (3D) dan dua dimensi (3D) [7]. Dari proses tersebut pada kultur 3D menunjukkan ciri-ciri morfologi yang khas dari jaringan perut manusia [7]. Ketika *spheroid* ditransfer ke dalam kultur 2D menyebabkan terjadinya pembentukan kultur planar yang padat [7].



Gambar 2. Hasil transfer spheroid kultur 3D ke dalam kultur 2D

## 2. Metode Pembuatan *Immortal Cell Line*

Pembuatan *immortal cell line* dapat dilakukan dengan pendekatan yang berbeda-beda, diantaranya adalah melalui proses *telomerase reverse transcriptase* (TERT), mutase sel cek poin (p53/pRb), dan onkogen serta onkoprotein [15]. Pada penelitian Hammiller *et al* [16] Pembuatan sel immortal menggunakan sel epidermis atau sel keratinosit yang dilakukan pada medium tinggi kalsium (HiCa). Hica merupakan media yang terbuat dari *Lonza Bio Whittaker Minimum Esensial Medium Eagle (EMEM)*, dengan larutan garam yang seimbang, asam amino non-esensial, dan l-glutamin tanpa kalsium klorida dan disuplemen dengan 8% fetal bovine serum, 0,8% Pen Strep dan 60  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  [16]. Pembuatan sel keratinosit primer ini merupakan pembuatan sel immortal melalui cara onkogen [17].

### Preparasi dan Kultur Sel Keratinosit Primer

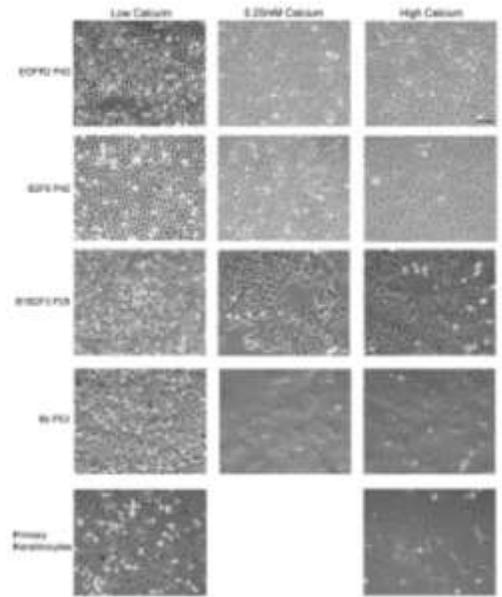
Kulit tikus yang baru lahir disimpan dalam 0,25% tripsin/EDTA pada suhu 4°C [16]. Epidermisnya diangkat menggunakan *forceps*, media Hica ditambahkan pada

epidermis kemudian disentrifugasi [16]. Sel dihitung dan ditempatkan pada media HiCa dengan berat jenis sekitar  $2 \times 10^5$  sel/cm<sup>2</sup> [16]. Delapanbelas jam kemudian media dipindahkan, piringannya dicuci dengan PBS, dan sel disimpan pada media LoCa (0,05 mM kalsium) [16]. Pada waktu yang bersamaan disiapkan keratinosit dari tikus dengan genotip campuran, kulit abdominal ditandai dengan nomor identifikasi yang permanen [16].

### Imortalisasi Kultur Primer

Keratinosit disiapkan pada medium HiCa dengan *6-well plates* pada densitas satu tikus/piringan [16]. Sekitar 18 jam kemudian, medium dipindahkan, sel dibilas dengan PBS dan disimpan selama 2-3 hari pada media LoCa yang mengandung 10ng/ml KGF [16]. Setelah sekitar satu bulan, keratinosit yang sehat dalam piringan sesekali diamati dan dibagi menjadi koloni yang kecil dan morfologinya menyerupai keratinosit primer [16]. Kemudian dibilas dengan PBS, diinkubasi selama beberapa menit dengan 0,25% tripsin-EDTA sampai

sel terpisah dari piringan, disentrifugasi selama 3 - 5 menit pada 800 rpm (0,2 G), supernatan dibuang, pelet sel disuspensi dalam media HiCa dengan KGF, dan sel-sel berlapis di piringan tanpa memperluas kultur [16]. Delapan belas jam setelah replating, kultur dicuci dengan PBS dan diberi nutrisi dengan medium Loca 10ng / ml KGF [16]. Kultur diberi nutrisi dengan media tersebut setiap 2-3 hari sampai menjadi konfluen lagi, dalam beberapa minggu [16]. Sel sel tersebut kemudian diberi perlakuan sama seperti yang telah dijelaskan di atas, namun kultur dibagi menjadi 1:2 [16]. Dilakukan subkultur dan pengulangan kembali dalam beberapa hari [16]. Setelah beberapa hari, konsentrasi KGF dalam medium dikurangi menjadi 5ng/ml dan kemudian ke 1 ng/ml [16]. Aliquot sel kemudian dibekukan dengan mengikuti protokol pembekuan standar dengan 10% dimetilsulfoksida (DMSO) pada media LoCa di P2-4[16]. Berikut hasil imortalisasi sel keratinosit primer dari kulit tikus.



Gambar 3. Karakteristik morfologi sel keratinosit primer hasil imortalisasi

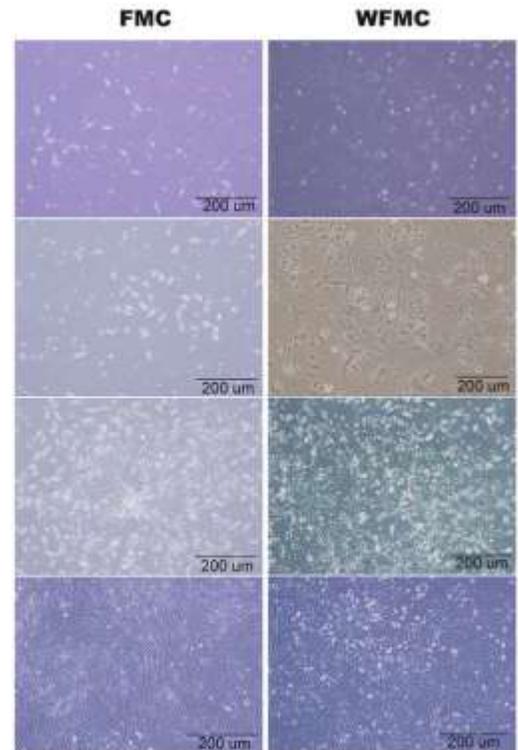
### 3. Metode Pembuatan *Stem Cell*

Untuk cara membuat *stem cell*, Nadri *et al* [18] menggunakan tikus sebagai hewan uji dan sel yang dikulturnya adalah *Mesenchymal stem cells* (MSCs). Pembuatannya diawali dengan mengisolasi sel dari tikus yang berusia 6-8 minggu [18]. Bagian tulang paha diambil dengan hati-hati, kemudian jaringan lunak yang melekat dibersihkan [18]. Masing-masing tulang diangkat dengan *rongeur* dan sumsum tulang diambil dengan menggunakan *syringe* dan dibilas dengan *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) [18]. Sel-sel sumsum

tulang kemudian disaring dengan saringan mesh nilon 70-mm [18]. Sel-sel disimpan pada 6-well plate kultur sel dengan densitas  $25 \times 10^6$  sel/well dalam DMEM yang mengandung 15% fetal bovine serum, 2 mm L-glutamine, 100 u/ml penisilin dan 100 u/ml streptomisin[18]. Kultur disimpan pada suhu 37 °C dalam suasana lembab dengan kandungan CO<sub>2</sub> 5% [18]. Saat Kultur primer mendekati konfluen, kultur dibuat dalam 0,5 ml dari 0,025% [18]. Tripsin yang mengandung 0,02% EDTA disimpan selama 2 menit pada suhu kamar[18]. Sel-sel yang sudah diangkat pada menit ke 2, dipanen dan dikultur dalam labu berukuran 25cm<sup>2</sup>[18]. Setelah kultur mencapai 70-80% konfluen, sel-sel dipanen untuk dilakukan eksperimen lebih lanjut [18].

Beberapa sel sumsum tulang yang dikultur tanpa perlakuan dijadikan sebagai kontrol yang sering disebut sebagai sel WFMC [18]. Sebagai kultur sel kontrol, WFMCs dikultur dalam 6-well plate dengan densitas  $25 \text{ sel} \times 10^6$  per well dalam DMEM

dan media kultur diubah setelah 72 jam untuk pertama kalinya [18].



Gambar 4. Kultur sel Sumsum tulang tikus

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelusuran pustaka yang telah dilakukan dapat diketahui cara pembuatan kultur sel primer, *immortal cell line* dan *stem cell* dari sel hewan ataupun sel manusia dengan menggunakan media yang sama yaitu *Modified Eagle Medium* (MEM) dan menggunakan prosedur yang berbeda.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan

karunia-Nya *review* artikel ini dapat diselesaikan dengan baik. Terimakasih kepada kedua orang tua yang selalu mendoakan, dosen mata kuliah metodologi penelitian yang telah memberikan ilmu yang begitu bermanfaat, dan kepada Ibu Irma Melyani Puspitasari selaku dosen pembimbing yang senantiasa membimbing penulis, memberikan saran serta perbaikan-perbaikan dalam penulisan *review* artikel ini.

#### **KONFLIK KEPENTINGAN**

Seluruh penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

1. Thermo Fisher Scientific: Cell Culture Basics Handbook. UK: Gibco;2015:  
[www.lifetechnologies.com/cellculturebasics](http://www.lifetechnologies.com/cellculturebasics)
2. Thorpe TA. History of Plant Tissue Culture. *Molecular Biotechnology*. 2007;37(2):169-80.
3. Correa P. Bacterial infections as a cause of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:E3.
4. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, Martel C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 2015;136:487–90.
5. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118:3030–44.
6. IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7–14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:1–241.
7. Schlaermann P, Toelle B, Berger H, Schmidt SC, Glanemann M, Ordemann J, et al. A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori*

- infection in vitro. *Gut*. 2016;65:202–213
8. Iwata T, Washio K, Yoshida T, Ishikawa I, Ando T, Yamato M, et al. Cell sheet engineering and its application for periodontal regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(4):343–356.
  9. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell*. 2013;12(6):689–698.
  10. Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, et al. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells*. 2010;28(10):1829–1838.
  11. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 2010;6:25–36.
  12. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011;141:1762–72.
  13. Stange DE, Koo BK, Huch M, Sibbel G, Lyubimova A, Kujala P, et al. Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. *Cell*. 2013;155:357–68.
  14. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003;423:448–52
  15. Masqood MI, Matin MM, Bahramii AR, Ghasroldasht M. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biology International*. 2013.
  16. Hammiler BO, El-Baseri TG, Dulgoz AA, Hansen LA. A Methode for the Immortalization of Newborn Mouse

- Skin Keratinocytes. *Front Oncol.* 2015;5:177.
17. Balmain A, Yuspa SH. Milestones in skin carcinogenesis: the biology of multi stage carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 2014;134(e1):E2–7.
18. Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A and Izadpanah R. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 2007;51: 723-729.