

Laporan Penelitian**Metode biakan jaringan kolesteatoma
pasien otitis media supuratif kronik tipe bahaya****Ratna Dwi Restuti**Departemen Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok-Bedah Kepala Leher
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo
Jakarta**ABSTRAK**

Latar belakang: Biakan jaringan merupakan suatu teknik memperbanyak sel atau jaringan secara in vitro. Dengan biakan jaringan dapat dipelajari berbagai sifat sel serta aplikasinya. Demikian juga jaringan kolesteatoma pasien otitis media supuratif kronik dapat digunakan metode biakan jaringan untuk mempelajari sifat jaringan kolesteatoma hingga tingkat sel. **Tujuan:** Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari metode biakan jaringan kolesteatoma, sehingga didapatkan tahap-tahap biakan beserta teknik operasional baik alat spesifik yang digunakan, jumlah sel yang ditanam, lingkungan yang baik sehingga diperoleh viabilitas sel dan hasil biakan yang baik. **Metode:** Penelitian ini terdiri atas tiga tahap yaitu: 1) tahap penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk menentukan metode teknik biakan sel keratosit kolesteatoma, 2) tahap menanam sel keratosit, 3) tahap memanen sel keratosit (*harvest*). **Hasil:** Setelah penelitian ini, untuk mendapatkan hasil pertumbuhan dan viabilitas yang optimal, maka diperlukan metode sebagai berikut: 1) petri yang digunakan untuk menanam sel keratinosit kolesteatoma adalah petri dengan diameter 1 cm, 2) jumlah sel yang ditanam per-cm² luas permukaan bidang tanam adalah 1-2 x 10⁴ sel per-cm², 3) waktu tripsinisasi saat pengangkatan sel adalah 30 detik. **Kesimpulan:** Biakan sel adalah biakan yang diambil dari dispersi sel organ tertentu yang dilakukan dengan cara enzimatik, mekanik dan disgregasi secara kimiawi. Biakan keratinosit memiliki rentang waktu yang pendek dan hendaknya diwaspadai tercampur dengan fibroblas. Keratinosit memiliki waktu paruh replikasi yang sangat terbatas dan terdapat hubungan antara usia dengan penurunan jumlah generasi. Hal ini dikaitkan dengan usia, perubahan membran sel dan komponen matriks.

Kata kunci: kultur jaringan, kolesteatoma, otitis media supuratif kronik.

ABSTRACT

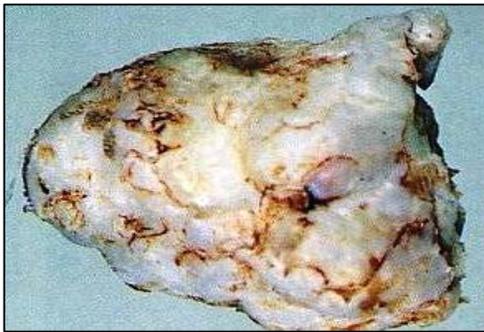
Background: Tissue culture is a technique to multiply cells or tissue in vitro. With tissue culture cells can be studied as well as the nature of the application. Similarly, tissue culture methods can be applied also to cholesteatomas of chronic suppurative otitis media patients that can be used to study the nature of cholesteatomas to the cellular level. **Purpose:** The purpose of this study was to get tissue culture methods for cholesteatomas, so that the steps, techniques and specific tools for culturing cholesteatoma can be determined, also the number of cells that were planted, good environment in order to obtain cell viability and good culture results. **Methods:** This study consists of three phases: 1) Preliminary research phase aimed to determine the method of cell culture techniques of cholesteatomas keratinocytes. 2) The stage of planting keratinocyte cells. 3) Phase keratinocytes cell harvest (*harvest*). **Results:** After this study, to get the optimal growth and viability, it would require the following methods: 1) Petri dish used for growing cholesteatomas keratinocyte cell is 1 cm diameter petri dish; 2) The number of cells that were grown per cm² of surface area of planting was 1-2 x 10⁴ cells per cm²; 3) The tripsinization time while harvesting cell was 30 seconds. **Conclusion:** Culture of cells was taken from the dispersion of certain organ which was done by enzymatic, mechanical and chemical disaggregation. Cultured keratinocytes had a short span of time and could be mixed with fibroblasts. Keratinocytes had a very limited replication half-life and there was a relationship between age and decline in the number of generations. This was associated with age, changes in the cell membrane and matrix components.

Keywords: tissue culture, cholesteatoma, CSOM.

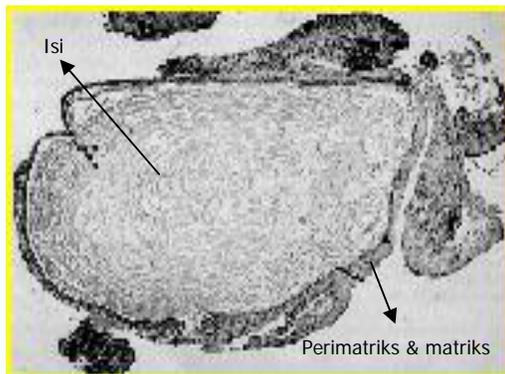
Alamat korespondensi: Ratna Dwi Restuti. e-mail: ratna.drest@gmail.com

PENDAHULUAN

Kolesteatoma terdiri atas 3 komponen yaitu komponen perimatriks, matriks, dan isi kolesteatoma berupa jaringan nekrotik. Perimatriks disebut juga sebagai stroma kolesteatoma, merupakan bagian dari matriks yang melekat pada jaringan sekitarnya. Matriks kolesteatoma disebut juga sebagai kapsul kolesteatoma, merupakan bagian yang memiliki sifat tumbuh terus-menerus.^{1,2}



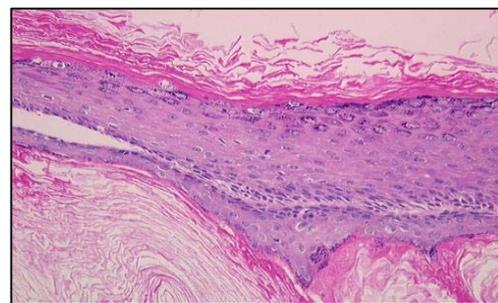
Gambar 1. Makroskopis kolesteatoma, berupa massa keputihan.²



Gambar 2. Mikroskopis matriks kolesteatoma.²

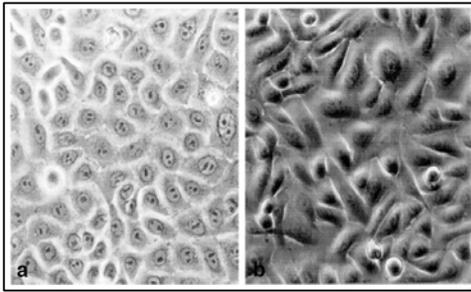
Kolesteatoma merupakan suatu kista yang bersifat jinak. Secara histologi matriks kolesteatoma memiliki epitel skuamosa berkeratin (gambar 3). Matriks tersebut terdiri atas: 1) lapisan basal atau stratum germinativum yang memiliki epitel kubus (*columnar*);

2) malphigian atau lapisan spinal terdiri atas sel-sel besar berbentuk silindris; 3) lapisan granular, sel-selnya berbentuk lebih pipih dan terdapat granul keratohialin yang hiperkromatik pada sitoplasmanya; 4) stratum lusidum; lapisan ini sering kali tidak tampak; 5) lapisan keratin, tampak berdeskuamasi dan hiperkromatik. Seperti halnya epitel kulit, kolesteatoma juga mengandung sel dendrit, yaitu sel Langerhans. Jenis kolesteatoma didapat mengandung lebih banyak sel Langerhans dibanding dengan kolesteatoma kongenital. Hal ini disebabkan karena pada kolesteatoma didapat, lebih banyak terjadi reaksi inflamasi yang disebabkan oleh antigen. Keratinosit merupakan komponen terbesar sel epidermis yang terdapat pada bagian basal epidermis. Komponen ini sangat berperan pada respons-imun lokal. Secara imunohistokimia keratinosit pada kolesteatoma banyak memproduksi IL-1.^{1,3-5}



Gambar 3. Gambaran histologi kolesteatoma.⁴

Keratinosit merupakan sel pada epidermis yang dominan dan terletak di membran basal epidermis. Dari dalam ke arah luar, setelah lapisan basal terdapat lapisan spinosus, lapisan granular, dan lapisan tanduk. Proliferasi sel terutama terjadi di lapisan basal.⁵



Gambar 4. Bentuk poligonal epitel kulit liang telinga dalam biakan (a) dan kolesteatoma dalam biakan (b), dengan pembesaran 200x.⁴

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode yang baik dan mengetahui kondisi optimal untuk membiakkan jaringan kolesteatom yang berasal dari penderita OMSK dengan kolesteatom.

METODE

Penelitian ini terdiri atas tiga tahap yaitu pertama tahap penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk menentukan metode teknik biakan sel keratosit kolesteatoma. Tahap berikut adalah menanam sel keratosit, kemudian tahap memanen sel keratosit (*harvest*).

Tahap menentukan metode teknik biakan. Pada tahap menentukan metode teknik biakan, penelitian pendahuluan dikerjakan dalam beberapa tahap, yaitu *menentukan jenis/diameter sumur yang digunakan untuk biakan*. Diameter dan luas permukaan sumur yang digunakan akan mempengaruhi jumlah sel yang harus ditanam per sumur. Beberapa jenis sumur yang tersedia di pasaran antara lain berdiameter 8,5 cm; 3,8 cm; dan 1 cm.

Menentukan jumlah sel yang harus ditanam per cm² luas permukaan bidang tanam. Pada tahap ini faktor-faktor yang harus dipertimbangkan adalah a) terjadi pertumbuhan yang baik karena jumlah sel cukup/tidak terlalu sedikit; b) pada sumur tidak terjadi pertumbuhan berlebihan (*over-growth*); c) mempertimbangkan keterbatasan jumlah suspensi sel yang dimiliki.

Tahap menentukan waktu tripsinisasi.

Tripsinisasi dilakukan pada saat panen untuk melepaskan sel-sel yang menempel pada dasar sumur. Pada tahap ini terdapat 2 faktor yang dipertimbangkan, yaitu a) semua sel pada dasar sumur dapat terangkat waktu panen (*harvest*); b) tidak banyak sel yang mati akibat waktu pemberian tripsin yang terlalu lama. Viabilitas yang diharapkan lebih dari 90%.

Untuk memenuhi tujuan tersebut, dilakukan percobaan lama pemberian tripsin waktu panen sel. Selain itu pada dasar sumur diamati dengan mikroskop untuk melihat ada tidaknya sel yang masih tertinggal di dasar sumur.

Dilakukan percobaan untuk menentukan waktu tripsinisasi. Berdasarkan percobaan tersebut, maka diputuskan untuk melakukan tripsinisasi 30 detik. Pertimbangan yang mendasari ada 2 hal, yaitu 1) tidak terdapat sisa sel pada sel sumur setelah tripsinisasi; 2) viabilitas sel masih cukup baik (lebih dari 90%).

Pada saat tepat dicapai waktu tripsinisasi 30 detik, ditambahkan medium biakan

ke dalam sumur biakan dan langsung dipindahkan ke tabung untuk sentrifugasi dan pencucian. Tujuan penambahan medium biakan tersebut adalah untuk dapat dicapai waktu yang sama mengakhiri tripsinisasi.

Matriks kolesteatoma yang berasal dari pasien OMSK dengan kolesteatoma, ditempatkan pada wadah steril yang berisi medium RPMI sesegera mungkin. Prosedur biakan kolesteatoma dibagi menjadi 3 tahapan, yaitu 1) tahap membuat jaringan padat menjadi suspensi sel; 2) tahap membiakkan/ menanam sel kolesteatoma.

Selanjutnya adalah *tahap membuat jaringan padat menjadi suspensi sel*. Prosedur membuat jaringan padat menjadi suspensi sel dilakukan sesuai dengan prosedur yang dikemukakan oleh Freshney,⁶ dengan beberapa modifikasi yaitu matriks yang berasal dari jaringan kolesteatoma dibilas dengan medium sebanyak 5 kali atau sampai bersih dalam cawan petri besar (diameter 100 mm). Untuk setiap pembilasan digunakan peralatan yang baru (steril). Matriks yang telah dibilas tadi diletakkan pada cawan petri baru dengan posisi epidermis di bawah dan diirigasi dengan PBS secukupnya. Lapisan dermis serta lapisan subkutan diangkat sebanyak mungkin dengan gunting bengkok (lengkung) dan dibuang.

Sisa jaringan dibilas 5 kali dengan larutan-larutan PBS tanpa Ca^{++} , Mg^{++} dan direndam dalam tripsin 0,2% (1:250) dingin (*ice-cold*) dalam PBS tanpa Ca^{++} , Mg^{++} (pH 7,2). Biasanya untuk 5-8 potong

jaringan (kira-kira $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$) diperlukan 10-15 mL tripsin pada cawan petri plastik berdiameter 100 mm. Potongan matriks dalam tripsin 0,2 % tersebut diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C sampai terlihat pemisahan epidermis.

Epidermis yang telah terpisah dari dermis tadi, dipindahkan ke cawan petri lain yang berisi medium dengan menggunakan pinset steril. Dengan 2 jarum steril lapisan epidermis dikoyak-koyak untuk memisahkan sel-sel keratinosit satu sama lain.

Medium berisi suspensi sel keratinosit diambil dengan pipet dan dimasukkan ke dalam tabung steril. Untuk menghindari banyak sel yang hilang, maka ukuran cawan petri yang digunakan disesuaikan dengan jumlah matriks. Pada pembilasan ketiga digunakan medium pembilas secukupnya (tidak terlalu banyak). Cawan petri dan pipet yang telah digunakan dibilas dengan medium dan dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi epidermis. Medium pada tabung ditambah hingga 10-15 mL, kemudian dicampur dengan melakukan pemipetan berulang secara perlahan-lahan. Larutan pada tabung disaring dengan menggunakan kasa steril 6 lapis, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Selanjutnya dilakukan pencucian dalam medium dengan sentrifugasi 2 kali selama 10 menit, 1200 rpm (*Hettich*). Supernatan dibuang, pelet ditinggalkan, dan dilakukan resuspensi hingga 3 mL.

Dilakukan penghitungan jumlah sel total dan viabilitas sel. Pada tahap ini suspensi sel siap untuk ditanam (dibiakkan).

Tahap selanjutnya adalah menanam sel keratinosit kolesteatoma. Sebanyak 2×10^4 sel/cm² dimasukkan ke dalam petri yang berisi medium lengkap (RPMI dan FBS 20%). Diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam, pada suhu 37⁰C, dengan kadar CO₂ 5%.

Setelah itu dilakukan **tahap memanen sel.** Cawan petri biakan dikeluarkan dari inkubator setelah durasi biakan selesai. Medium biakan pada masing-masing sumur ditetesi dengan 1 tetes tripsin 0,2% selama 30 detik untuk mengangkat sel yang menempel di dasar sumur. Ditambahkan 200 µL medium biakan pada tiap sumur, tepat 30 detik setelah pemberian tripsin. Medium biakan beserta sel dipindahkan ke tabung Eppendorf dan ditambahkan medium hingga volume 1,5 mL. Selanjutnya dilakukan pen-

cucian dalam medium dengan sentrifugasi selama 10 menit, 1200 rpm (*Hettich*). Supernatan dibuang, pelet ditinggalkan dan dilakukan resuspensi hingga 1 mL, lalu dilakukan **penghitungan jumlah sel total dan viabilitas sel.**

HASIL

Setelah penelitian ini, untuk mendapatkan hasil pertumbuhan dan viabilitas yang optimal, maka diperlukan metode sebagai berikut: 1) petri yang digunakan untuk menanam sel keratinosit kolesteatoma adalah petri dengan diameter 1 cm; 2) jumlah sel yang ditanam per-cm² luas permukaan bidang tanam adalah 1-2 x 10⁴ sel per-cm²; 3) waktu tripsinisasi saat pengangkatan sel adalah 30 detik.

Tabel 1. Waktu tripsinisasi

Waktu	10 detik	20 detik	30 detik
Sisa sel pada dasar sumur	Terdapat sisa sel	Terdapat sisa sel	Tidak ada
Viabilitas			Viabilitas 98.6% dan 97.9%
Waktu	30 detik	40 detik	50 detik
Sisa sel pada dasar sumur	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
Viabilitas	94.2%	57.8%	49.4%

Tabel 2. Pengamatan pertumbuhan sel dalam sumur berdiameter 1 cm selama biakan

No	Jumlah sel yang ditanam (sel)	Pengamatan
1	1×10^3	Pertumbuhan sel tidak penuh / merata
2	1×10^4	Pertumbuhan sel rata, tidak terlalu padat (<i>overgrowth</i>)
3	1×10^5	Pertumbuhan sel rata, tidak terlalu padat (<i>overgrowth</i>)

DISKUSI

Biakan jaringan merupakan suatu metode untuk mempelajari perilaku sel, tanpa pengaruh berbagai variasi sistemik, baik pada keadaan homeostatis maupun keadaan stress

percobaan. Biakan sel adalah biakan yang diambil dari dispersi sel organ tertentu, sesuai kebutuhan. Dispersi sel dapat dilakukan dengan cara enzimatik, mekanik dan disagregasi secara kimiawi.⁶

Biakan jaringan memiliki beberapa kelebihan, antara lain: a) lingkungan dapat dikontrol, b) karakteristik dan homogenitas sampel dapat dipilih, c) lebih menghemat bahan dibandingkan dengan percobaan *in vivo*. Selain kelebihan, biakan jaringan memiliki beberapa keterbatasan, antara lain: a) rentan terhadap kontaminasi, baik kontaminasi bakteri maupun jamur, b) diperlukan usaha untuk memproduksi sejumlah sel dari jaringan yang sangat terbatas, c) diperlukan identifikasi sel.⁶

Biakan keratinosit memiliki rentang waktu yang pendek dan hendaknya diwaspadai tercampur dengan fibroblas. Keberadaan fibroblas pada biakan keratinosit merupakan masalah karena kecepatan pertumbuhan fibroblas lebih tinggi dibanding dengan kecepatan pertumbuhan keratinosit. Kondisi demikian dapat menyebabkan pertumbuhan yang berlebihan (*overgrowth*). Ponc⁷ menuliskan bahwa keratinosit memiliki waktu paruh replikasi yang sangat terbatas dan terdapat hubungan antara usia dengan penurunan jumlah generasi. Hal ini dikaitkan dengan usia, perubahan membran sel, dan komponen matriks.

Pada penelitian ini disimpulkan bahwa untuk mendapatkan pertumbuhan dan viabilitas yang optimal untuk menanam biakan sel keratinosit kolesteatom diperlukan kondisi yang tepat. Kondisi tersebut adalah ukuran petri dengan diameter 1 cm, jumlah sel yang ditanam per-cm² luas permukaan bidang tanam adalah $1-2 \times 10^4$ sel per-cm², serta waktu tripsinisasi saat pengangkatan sel selama 30 detik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ferlito A. A review of definition, terminology and pathology of aural cholesteatoma. *J Laryngol Otol* 1993; 107:483-8.
2. Liston SL, Duvall AJ. Embryology, anatomy, and physiology of the ear. In: Adam G, Boies L, Hilger P, editors. *Fundamentals of otolaryngology*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1989. p. 27-38.
3. Slattery WH. Pathology and clinical course of inflammatory disease of middle ear. In: Glasscock ME, Gulya AJ, editors. *Surgery of the ear*. 5th ed. Ontario: SC Decker; 2003. p. 167-93.
4. Proctor B. Chronic otitis media and mastoiditis. In: Zorab R, editor. *Otolaryngology*. Philadelphia: WB. Saunders Company; 1992. p. 1349-76.
5. Silverstein H, Isaacson JE, Olds MJ, Rowan PT, Rosenberg S. Dexamethazone inner ear perfusion for the treatment of Meniere's disease: a prospective, randomized, doubleblind, crossover trial. *Am J Otol* 1998; 19:196-201.
6. Silverstein H, Choo D, Rosenberg SI, Kuhn J, Florida S, Seidman M, et al. Intratympanic steroid treatment of inner ear disease and tinnitus. *Ear Nose Throat J* 1996; 75:468-87.
7. Ponc M. Effects of glucocorticoids on cultured skin fibroblast and keratinocytes. *Int J Dermatol* 1984; 23:11-23.

