Hayati, Maret 2003, hlm. 34-37 Vol. 10, No. 1
ISSN 0854-8587

Studi *In Vitro* Biakan Sel Endotel Kelinci pada Media Cair dan Semi Padat

In Vitro Study of Rabbit Endothelial Cell Cultures in Liquid and Semisolid Media

EVA HARLINA[1], BAMBANG PONTJO PRIOSOERYANTO[1*], YUDI RIADI[2]

[1]Bagian Parasitologi dan Patologi, [2]Bagian Reproduksi dan Kebidanan, FKH, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diterima 29 Juli 2002/Disetujui 22 Oktober 2002

Endothelial cells derived from femoralis artery of rabbit were succesfully cultured *in vitro* in liquid medium of Dulbeco modified essential medium-Ham's F-12 (DME/F-12) and semi solid medium of collagen gel. The cells cultured in liquid medium grew and formed colony with a pattern of monolayer sheet. They were round to oval and spindle in shape. The cells were grown in collagen gel by using floating and gel-embedded system to show their three-dimensional structure. The growth pattern of the cells cultured in both collagen gel systems showed a formation of irregular fibrous-like structure, elongated cells and colony with duct-like structure as well as radiating projection pattern and formation of a large lumen like structure. Histological findings using Haematoxylin and Eosin staining showed development of a compact cell colony which formed a monolayer sheet with a cell layer of fibroblast and a thin collagen layer. Immunohistochemically, endothelial cells showed positive reaction for anti-Factor VIII Related-Ag (F VIII R-Ag), with smooth fiber pattern in cytoplasm running along the cell border.

PENDAHULUAN

Dalam proses perkembangan tumor, peradangan dan transplantasi jaringan, angiogenesis atau pembentukan buluh darah yang baru merupakan satu hal yang memegang peranan sangat penting. Hingga kini belum dapat dipahami dengan pasti proses perkembangan buluh darah terutama dalam kaitannya dengan proses perkembangan tumor, regenerasi dan transplantasi jaringan. Pengetahuan dasar tentang kondisi yang optimal untuk pembentukan buluh darah secara *in vitro*, morfologi, fisiologi serta struktur tiga dimensi dalam biakan sel sangat diperlukan dalam memahami proses tersebut di atas.

Pembiakan sel endotel secara *in vitro* telah dilakukan oleh Mori *et al.* (1988) dan pertumbuhan optimum dipengaruhi oleh jenis media, konsentrasi serum, dan faktor tumbuh. Mitsui *et al.* (1991) melakukan pembiakan sel endotel dari segmen buluh darah (*organoid culture*) dan menemukan adanya pertumbuhan dalam bentuk buluh-buluh halus yang tumbuh bercabang-cabang. Dalam penelitian kami terdahulu menggunakan beberapa materi jaringan asal tumor (Priosoeryanto 1994), biakan sel endotel dalam media gel kolagen membentuk struktur yang mirip buluh-buluh halus dan dengan pewarnaan hematoksilin dan eosin memberikan gambaran seperti saluran (duktus). Pembentukan struktur seperti buluh halus juga terjadi pada biakan sel asal kelenjar ambing (Priosoeryanto *et al.* 1995a, b).

Penggunaan media semi padat seperti gel kolagen dalam biakan sel sangat membantu dalam memahami proses pertumbuhan suatu jenis sel secara tiga dimensi seperti kelenjar ambing (Priosoeryanto *et al.* 1995a) dan papila vateri dari organ lidah (Niishi *et al.* 1992). Berdasarkan hal tersebut, media biakan sel menggunakan gel kolagen atau agar-agar lunak merupakan media yang cocok untuk mengamati angiogenesis secara *in vitro*. Metode ini diharapkan dapat menyerupai kondisi *in vivo*, karena secara *in vivo* angiogenesis sulit diamati.

Dalam penelitian ini dilakukan pembiakan sel endotel dari buluh darah hewan donor secara *in vitro* dalam media cair dan media semi padat guna mengetahui kondisi yang paling cocok untuk pertumbuhan maksimum sel endotel. Pengamatan ciri-ciri fisiologi, morfologi, maupun struktur tiga dimensi biakan sel dilakukan dengan menggunakan mikroskop fase-kontras dan teknik histologi. Informasi yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat berguna dalam penentuan strategi pencegahan dan pengobatan kasus tumor, peradangan, transplantasi, dan produksi buluh darah buatan pada penyakit kardiovaskuler.

BAHAN DAN METODE

Biakan Sel Endotel Buluh Darah Arterial. Arteri femoralis kelinci dipisahkan dari jaringan sekitarnya, lalu disimpan dalam media DME/F-12 (Sigma, USA) yang berisi *fetal calf serum* (FCS) 10%, penisilin 100 IU/ml, dan streptomisin 100 μg/ml selama 30 menit pada suhu 4°C untuk proses sterilisasi. Jaringan buluh darah dicincang sehalus mungkin menggunakan gunting, ditambah kolagenase (Wako,

* Penulis untuk korespondensi, Fax. +62-251-421807,
E-mail: bpontjo@indo.net.id

Jepang) sebanyak 3 mg/ml media, FCS 10%, dan antibiotika, lalu diinkubasikan dalam inkubator CO_2 5% bersuhu 37°C selama 8-14 jam. Suspensi sel disaring menggunakan saringan nilon yang berpori-pori 80 µm. Sel-sel tunggal dan kelompok sel (*cell clump*) kemudian dibiakkan dalam media cair maupun semi padat yang ditambah faktor penumbuh FCS. Pengamatan pertumbuhan sel dilakukan dengan menggunakan mikroskop fase-kontras (Carl-Zeis, Jerman) setiap 24 jam dan setelah sel tumbuh pengamatan dilakukan setiap 6 jam hingga pertumbuhan sel menutupi permukaan cawan Petri (*confluence*).

Biakan Sel pada Gel Kolagen. Kolagen tipe I yang berasal dari tendon babi (Cell matrix IA, Nitta, Osaka, Jepang) diencerkan menurut petunjuk dari pabrik pembuat, kemudian ditambahkan media DME/F-12, FCS dan antibiotika. Campuran tersebut digunakan sebagai media tumbuh. Untuk biakan terapung, sebanyak 1.5 ml gel kolagen dituang ke dalam cawan Petri. Setelah gel mengeras dengan menginkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, kemudian ditambahkan 2 ml suspensi sel ke atas permukaan gel. Sedangkan untuk sistem terbenam dilakukan dengan cara menambahkan 1.5 ml gel kolagen pada pelet sel hasil sentrifugasi, kemudian dituangkan ke dalam cawan Petri. Biakan kemudian diinkubasi pada inkubator CO_2 5% bersuhu 37°C dan pengamatan pertumbuhan sel endotel dilakukan setiap 24 jam.

Teknik Histologi. Biakan sel endotel buluh darah yang tumbuh pada media semi padat gel kolagen, difiksasi dalam larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10%. Biakan sel tersebut didehidrasi menggunakan larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat, diblok dengan parafin dan dipotong setebal 3-5 µm menggunakan mikrotom. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoksilin dan eosin, struktur sitologi serta morfologi sel diamati menggunakan mikroskop cahaya.

Imunohistokimia. Antibodi terhadap Factor-VIII Related-Antigen/F-VIII R-Ag (Dako, USA) digunakan untuk karakterisasi biakan sel endotel hasil pertumbuhan in vitro. Biakan sel dari sediaan histologi maupun sediaan di atas gelas penutup direaksikan dengan antibodi terhadap F-VIII R-Ag dan diinkubasikan semalam pada suhu 4°C, diinkubasi lanjut menggunakan serum yang sudah dilabel dengan biotin, kemudian direaksikan dengan sistem komplek avidin-biotin-peroksidase (ABC) (Vectastain, Vector Laboratories). Larutan diaminobenzidin tetrahidroklorida (DAB) dengan konsentrasi 70 mg/100ml PBS ditambahkan pada sediaan, hingga warna cokelat sebagai tanda reaksi positif timbul atau reaksi dapat ditunggu selama 10 menit (Priosoeryanto 1992).

HASIL

Dari hasil cincangan arteri femoralis kelinci yang diceraiberaikan menggunakan kolagenase sehingga menjadi suspensi sel tunggal maupun kumpulan sel dengan jumlah sekitar 100-200 sel, berhasil diperoleh biakan sel primer endotel yang tumbuh pada media cair. Waktu yang diperlukan bagi biakan sel endotel untuk tumbuh memenuhi cawan Petri sekitar 3 minggu. Dengan menggunakan mikroskop fase-kontras terlihat sel tumbuh membentuk satu lapis (*monolayer*) yang dimulai dari koloni sel dan kemudian menyebar memenuhi cawan. Pada biakan ini paling tidak diperoleh dua jenis tipe sel endotel, yaitu: sel dengan bentuk spindel dan lonjong memanjang dengan besar yang relatif seragam (Gambar 1) dan sel-sel yang hidup melekat pada dasar cawan dengan inti sel yang bulat dan anak inti yang jelas berwarna gelap, sedangkan sel yang mati terlihat sebagai sel yang melayang di dalam media dengan bentuk membulat, tepi-tepinya tidak beraturan dengan intensitas cahaya yang lebih cerah.

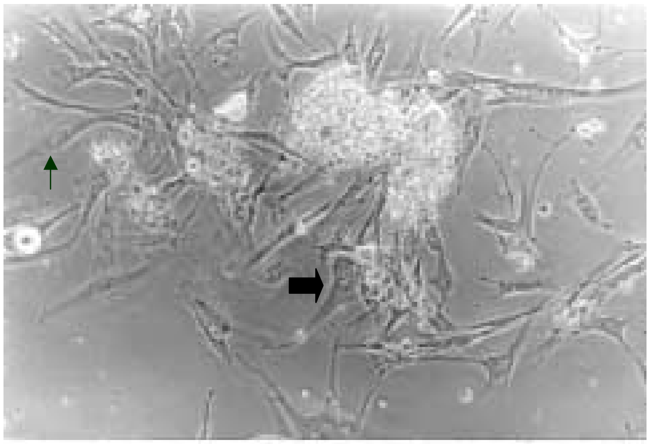
Selain pada media cair, biakan sel endotel berhasil pula ditumbuhkan pada media semi padat, yaitu gel kolagen sistem terapung dan terbenam dengan membentuk gambaran berpola tiga dimensi. Pada media gel kolagen dengan sistem terapung, tampak biakan sel tumbuh membentuk serabut-serabut halus yang tidak beraturan dengan bentuk sel yang memanjang. Secara histologi dengan perwarnaan hematoksilin dan eosin, tampak sel endotel berbentuk bulat lonjong, tumbuh di permukaan kolagen gel dengan struktur inti serta sitoplasma yang jelas (Gambar 2). Selain itu ditemukan pula adanya pertumbuhan sel endotel secara kompak berbentuk lapisan sel yang disertai adanya lapis fibroblas dan kemungkinan jaringan kolagen. Dijumpai pula suatu pola pertumbuhan dengan struktur yang menyerupai saluran atau duktus yang melingkar.

Pada biakan gel kolagen sistem terapung ditemukan juga pertumbuhan sel endotel yang saling berhubungan dengan membentuk satu lingkaran atau lumen yang sangat luas. Pada biakan sel sistem terbenam, pertumbuhan sel pada tahap awal terlihat sebagai suatu gumpalan atau sekelompok sel dengan pola yang kompak (*radiating projection*). Setelah biakan sel diinkubasi dengan waktu yang lebih lama, koloni sel endotel tumbuh membentuk pola saluran atau duktus bercabang (Gambar 3).

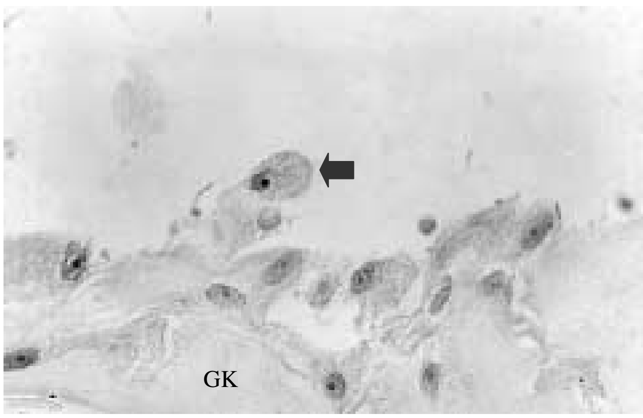
Secara imunohistokimia biakan sel pada media cair maupun gel bereaksi positif terhadap antibodi F-VIII R-Ag. Pola reaksi antigen-antibodi ini terlihat sebagai suatu serabut berwarna cokelat di dalam sitoplasma sel endotel yang berjalan memanjang mengikuti batas sel (Gambar 4).

PEMBAHASAN

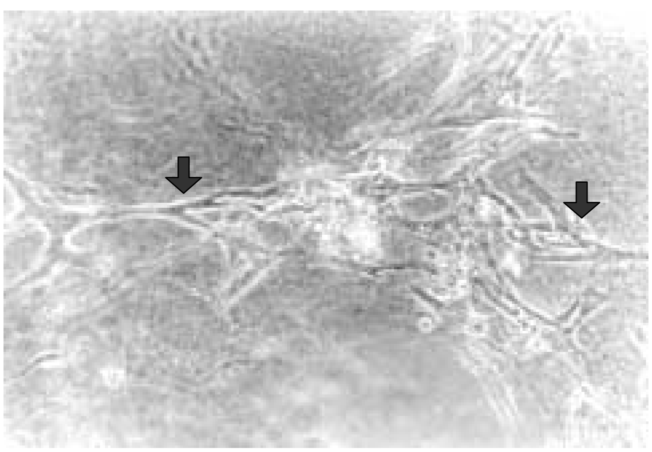
Waktu yang diperlukan sel untuk tumbuh pada biakan primer cukup lama karena bergantung pada sifat dan kemampuan sel untuk beradaptasi pada lingkungan *in vitro*. Biakan sel dari berbagai jaringan hewan juga memperlihatkan perbedaan waktu untuk tumbuh memenuhi dasar cawan (Priosoeryanto 1994). Waktu yang diperlukan oleh sel endotel untuk tumbuh memenuhi dasar cawan dalam studi ini cukup lama karena biakan sel yang digunakan adalah biakan primer, yang merupakan biakan sel langsung berasal dari jaringan *in vivo* (biopsi), sehingga memerlukan tahap adaptasi dari kondisi *in vivo* ke kondisi *in vitro.* Kondisi *in vitro* adalah kondisi yang sangat jauh berbeda dibandingkan dengan kondisi *in vivo* karena banyak terdapat keterbatasan untuk menyokong pertumbuhan sel secara optimum.



Gambar 1. Biakan sel endotel pada media cair DME/F-12 dari arteri femoralis kelinci. Biakan sel mulai tumbuh dari pertengahan koloni (warna terang) hingga memenuhi cawan. Bentuk sel *spindel* (panah kecil) dan lonjong memanjang (panah besar). Mikroskop fase-kontras, tidak diwarnai.

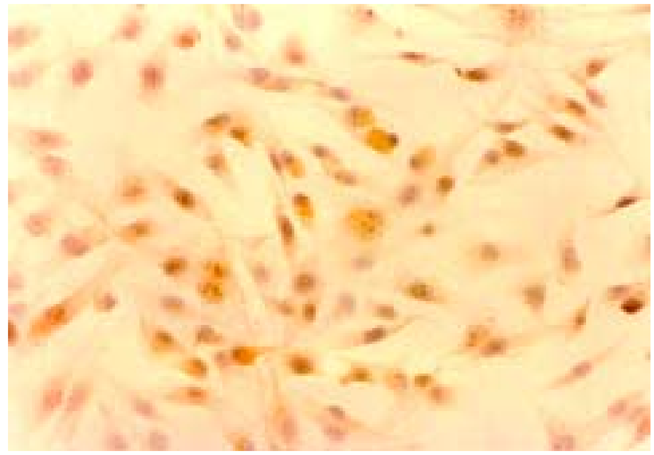


Gambar 2. Histologi sel endotel yang tumbuh pada media gel sistem terapung. Bentuk sel endotel bulat lonjong dengan struktur inti dan sitoplasma yang jelas. Sel (panah) dan gel kolagen (GK) berbatas jelas. Hematoksilin-Eosin.



Gambar 3. Struktur tiga dimensi sel endotel pada media gel kolagen sistem terbenam. Pertumbuhan sel membentuk pola seperti saluran atau duktus (panah). Mikroskop fase-kontras, tidak diwarnai.

Gambaran biakan sel dalam media cair yang terdiri atas 2 tipe sel, ternyata sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Kinard *et al*. (1997) yang membiakkan sel endotel dari arteri babi bersama sel otot polos dengan menggunakan sistem *co-culture* memakai membran mikropori. Pembentukan struktur seperti duktus atau saluran memanjang juga dijumpai pada biakan sel endotel ginjal manusia (Martin *et al*. 1997). Pada biakan gel kolagen sistem terapung ditemukan juga pertumbuhan sel endotel yang saling berhubungan dengan membentuk satu lingkaran atau lumen yang sangat luas. Pola pertumbuhan seperti ini juga ditemui pada penelitian Martin *et al.* (1997), yaitu adanya beberapa buah lingkaran dengan bentuk yang lebih kecil.



Gambar 4. Sel endotel yang direaksikan dengan anti-F VIII R-Ag. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna cokelat pada sitoplasma. Metode ABC dengan pewarna banding Hematoksilin.

Struktur tiga dimensi dengan pola seperti saluran dapat terjadi karena gel kolagen merupakan suatu matriks ekstraseluler yang bersifat kenyal sehingga memungkinkan sel melakukan penyebaran ke dalam atau menembus gel kolagen. Faktor lain yang diduga berperan dalam pembentukan struktur menyerupai saluran (*capilarry-like structure*) pada biakan sel endotel media gel kolagen ialah interaksi antara matriks ekstraseluler dengan zat intraseluler (Martin *et al*. 1997). Penelitian Priosoeryanto *et al*. (2002) yang menggunakan biakan sel berasal dari tumor kelenjar ambing anjing juga memberikan gambaran adanya pembentukan struktur saluran. Ment *et al.* (1997) dalam penelitiannya yang menggunakan sistem *co-culture* pada proses mikrovaskuler angiogenesis juga memperlihatkan gambaran struktur tiga dimensi dengan pola pembentukan duktus (struktur seperti arteri). Struktur tersebut seakan merefleksikan keadaan *in vivo* dari arteri yang memang tumbuh membentuk serabut dan bercabang-cabang.

Faktor VIII R-Ag merupakan suatu komponen yang terdapat dalam proses pembekuan darah dan merupakan komponen spesifik yang hanya dimiliki oleh sel endotel, sehingga reaksi positif terhadap anti F-VIII R-Ag menunjukkan bahwa sel tersebut adalah sel endotel (Stins *et al.* 1997).

Penggunaan gel kolagen sebagai media tumbuh sel endotel ternyata dapat membantu untuk memahami pertumbuhan, morfologi dan perkembangan sel endotel secara *in vitro* yang diharapkan dapat merefleksikan kondisi *in vivo*; sedangkan penggunaan media cair tampaknya tepat digunakan untuk memelihara biakan sel secara berkelanjutan untuk jangka waktu yang cukup panjang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DITBINLITABMAS, DITJEN DIKTI, DEPDIKNAS, RI yang telah membiayai penelitian ini melalui Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar Nomor: 16/PPID/1997/PPID/1997, tahun 1997/1998. Ucapan yang sama disampaikan pula kepada Laboratorium Patologi Veteriner dan Laboratorium Terpadu, FKH IPB yang telah mengizinkan penggunaan fasilitas laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

Kinard F, Sergent-Engelen T, Trouet A, Remacle C, Schneider YJ. 1997. Compartmentalized coculture of porcine arterial endothelial and smooth muscle cells on a microporous membrane. *In vitro Cell Dev Biol-Animal* 33:92-103.

Martin M, Schoecklmann H, Foster G, Maloney LB, Mckanna J, Daniel TO. 1997. Identification of a subpopulation of human renal microvascular endothelial cells with capacity to form capillary like cord and tube structures. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 33:261-269.

Ment LR, Stewart WB, Scaramuzzino D, Madri JA. 1997. An in vitro three-dimensional coculture model of cerebral microvascular angiogenesis and differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 33:655-658.

Mitsui YK, Saida N, Ishida T, Imamura, Kobayashi M. 1991. Establishment of vascular endothelial cell lines in serum-free culture and discovery of endothelin and a vasoactive intestinal contractor (VIC). *Cytotechnology* 5:S9-16.

Mori M, Sadahira Y, Kawasaki S, Hayashi T, Notohara K, Awai M. 1988. Capillary growth from reversed rat aortic segments cultured in collagen gel. *Acta Pathol Jpn* 38:1503-1512.

Niishi M, Nemoto N, Sakurai I. 1992. Three-dimensional reorganization of a cell line of papilla vateri adenocarcinoma in various culture conditions. *Acta Pathol Jpn* 42:15-24.

Priosoeryanto BP. 1994. Morphological and biological studies of tumor in domestic animals. [Disertasi]. Yamaguchi*:* United Graduate School of Veterinary Sciences, Yamaguchi University, Japan.

Priosoeryanto BP, Huminto H, Wibawan IWT, Tiuria R, Tateyama S. 2002. Morphological characteristics of in vitro cultured cells derived from tumor in domestic animals. *Hayati* 9:49-54.

Priosoeryanto BP, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K. 1995a. Establishment of a cell line (MCM-B2) from a benign mixed tumour of canine mammary gland. *Res Vet Sci* 58:272-276.

Priosoeryanto BP, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K. 1995b. Morphologic and tumourigenic behaviour of a cell line (MCM-B2) derived from a canine benign mixed mammary tumour transplanted into nude mice*. J Comp Pathol* 113:383-388.

Priosoeryanto BP, Yamaguchi R, Tateyama S, Matsuyama K. 1992. Microscopical and immunohistochemical studies on intestinal signet-ring cell and pulmonary bronchiolar-alveolar carcinoma in a cat. *Hemera Zoa* 75:57-69.

Stins MF, Prasadarao NV, Zhou J, Arditi M, Kim KS. 1997. Bovine brain microvascular endothelal cells tranfected with SV40-Large T antigen: Development of immortalized cell line to study pathophysiology of CNS disease. *In vitro Cell Dev Biol-Animal* 33:243-247.