

DEVELOPMENT *Spodoptera litura* CELL LINE CULTURE FROM PRIMARY CELL CULTURE EPITEL INTESTINE LARVAE WITH MONOLAYER METHOD

Nur Ducha dan Tri Mahanani Asri
Jurusan Biologi FMIPA UNESA

ABSTRACT

Insect cell culture is very important, because many benefits are to bioinsecticide virus (baculovirus) in large amounts. The success of cell culture insect can be seen from the success of creating a culture cell line. This research is to develop a research culture observation cell line epitel intestine larvae S. litura method based on the monolayer that has been successful in the primary culture. Results of research indicate that: 1) cells from monolayer primary culture can be separated with shake flask without using the enzyme, 2) the cells can be embedded in the culture bowls on the day of inoculation to three, 3) the cells can form a monolayer on the day of planting to five, 4) the results with the microscope observation showed that cells that have not been attached rounded shape, whereas cells that have been attached with oval shaped with rounded core of the small, 5) primary culture cells can be as many as ten subculture, 6) cell line growth is faster than the growth of cells primary. Conclusion of this research is a primary cell culture intestine epitel S. litura can subculture with monolayer method.

Key words: cells epitel primary intestinal, cell line culture, monolayer culture method, *Spodoptera litura*

PENGANTAR

Kultur sel hewan sekarang mulai berkembang. Banyak produk biologi dalam jumlah besar dikembangkan melalui kultur sel. Beberapa contoh produk biologi adalah: insulin, produksi obat terapeutik seperti hormon, protein fungsional dan peptida di dalam kultur sel vertebrata. Berbagai alkaloid bermanfaat di dalam kultur sel tanaman.

Kultur sel menjadi penting karena kemampuan individu organisme tingkat tinggi (eukariot) untuk menghasilkan protein komersial secara *in vivo* lebih rendah dibandingkan bakteri yang mudah dikembangkan dalam medium buatan. Oleh karena itu, sekarang telah dikembangkan metode untuk meningkatkan hasil produk protein komersial dari organisme tingkat tinggi (eukariot) melalui teknik kultur secara *in vitro* yaitu dengan teknik kultur jaringan/kultur sel (Goosen *et al.*, 1993).

Di Indonesia untuk kultur sel insekta belum banyak dikembangkan. Kultur sel insekta sangat bermanfaat untuk mengembangkan vektor atau sel pembawa yang berfungsi sebagai inang bagi Baculovirus (termasuk SpltMNPV) karena virus tidak dapat dibiakkan pada medium buatan seperti halnya mikroba lain (bakteri). Selain itu juga dapat untuk mengekspresikan beberapa gen asing (dari organisme tingkat tinggi) yang dititipkan pada sel yang akan dikultur atau pada mikroba perantara seperti virus. Selanjutnya sel rekombinan tersebut dikembangkan pada medium kultur dan mengekspresikan gen asing sehingga di dalam kultur tersebut akan terkumpul protein hasil

ekspresi sel rekombinan. Sistem kultur sel insekta menarik untuk diaplikasikan dalam skala besar karena kultur sel ini tidak dibatasi hanya untuk menumbuhkan Baculovirus seperti AcNPV atau SpltMNPV (Khususnya dari golongan Lepidoptera) saja, tetapi dapat juga untuk menumbuhkan virus penyebab penyakit manusia (demam berdarah) yang mempunyai vektor nyamuk (golongan Diptera). Apabila yang dikultur sel *Drophilla* sp. maka kultur ini dapat digunakan untuk studi genetik dan biologi molekuler dari lalat *Drosophilla* sp.

Selama beberapa tahun telah dikembangkan teknik kultur sel insekta. Pengembangan pertama kali kultur insekta dalam skala yang besar adalah untuk menghasilkan bioinsektisida. Virus insekta menarik sebagai bioinsektisida karena sangat spesifik untuk insekta dan tidak patogen untuk vertebrata (Podgwaite, 1985).

Pengembangan kulltur sel insekta membutuhkan peralatan dan bahan yang memadai, dengan pendekatan metode pada kultur sel vertebrata. Midgley *et al.*, 1998 telah berhasil mengkultur sel *line* (SF9) dari *Spodoptera frugiperda* sebagai inang untuk Baculovirus. Metode yang dikembangkan adalah dengan pembuatan *monolayer* dan kultur suspensi. Pertumbuhan populasinya yang paling cepat adalah dengan metode kultur suspensi. Dalam metode *monolayer*, sel ditumbuhkan secara kontinyu di dalam botol kultur yang dilengkapi sebuah batang magnet *stirrer* dengan kecepatan 80 rpm, yang tidak menimbulkan panas. Idealnya sel ditumbuhkan pada suhu 27°C, sel dapat dijaga

pertumbuhannya di dalam botol kultur plastik, tetapi jika sel melekat pada permukaan botol, sel dapat dilepas untuk disubkultur. Media yang dipakai adalah media dan serum atau media bebas serum. Kultur sel insekta dari sel SF9 lebih cepat pertumbuhannya. Dengan metode kultur suspensi, yaitu populasinya menjadi 2 kali lipat dengan waktu inkubasi (24 jam). Inkubator yang dipakai adalah inkubator tanpa CO₂.

Memperhatikan manfaat yang besar dari kultur sel insekta, maka perlu dikembangkan metode kultur sel insekta yang dapat dimanfaatkan terutama untuk memproduksi virus sebagai bioinsektisida. Asri dan Duchá (2006) telah berhasil mengembangkan kultur primer sel epitel usus *S. litura* dengan metode *monolayer*. Namun untuk keperluan industri maupun penelitian perlu dikembangkan kultur *cell line* yang berasal dari sub kultur primernya. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan kultur *cell line* epitel usus *S. litura*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk penelitian diantaranya adalah kultur primer sel epitel *S. litura*, antibiotik penisilin- streptomisin, larutan *Phospat Buffer Solution* (PBS), antifungi, medium *Grace's*.

Alat

Peralatan yang dibutuhkan diantaranya adalah *spuult* injeksi, mikroskop *inverted*, *laminar air flow*, pembakar spiritus, cawan kultur, membran *milipore*, inkubator, botol medium, kamera digital

CARA KERJA

Pengumpulan Data

Metode observasi digunakan untuk mengamati pertumbuhan kultur sel primer *S. litura* setelah di sub kultur beberapa kali dengan parameter pengamatan diantaranya adalah pelekatan sel pada cawan kultur (pelekatan dan perkembangan sel), mengamati kemungkinan terjadi tidaknya kontaminasi, mengamati bentuk sel sebelum melekat dan sesudah melekat, mengamati kemampuan sel untuk membentuk *monolayer*, mencari metode yang tepat untuk melepaskan sel-sel *monolayer* dari cawan kultur untuk di sub kultur, kemampuan kultur sel primer untuk di sub kultur.

Persiapan Medium Pertumbuhan

Medium yang dipakai untuk pemeliharaan kultur sel adalah medium khusus sel insekta yaitu medium *Grace's*. Untuk mempercepat pertumbuhan sel, maka medium tersebut harus ditambahkan serum yaitu *Foetal Bovine Serum* (FBS) dengan konsentrasi 10% dari medium. Agar tidak terjadi kontaminasi, maka dalam medium ditambahkan zat antibiotik yaitu penisilin streptomisin dan antifungi. Menjelang pelaksanaan kultur, medium ditambahkan zat perangsang tumbuh (FBS), antibiotik dan antifungi serta sterilisasi dengan menggunakan membran *millipore*.

Menyiapkan Kultur Primer Sel Epitel usus *S. litura*

Kultur primer sel epitel disiapkan dari epitel usus *S. litura* tahap larva instar 5. Berdasarkan hasil penelitian Asri dkk (2006) menunjukkan bahwa kultur primer epitel usus *S. litura* memiliki pertumbuhan yang paling optimal dari larva instar 5. Kultur primer untuk sub kultur dipilih yang sudah membentuk *monolayer* dan tidak terjadi kontaminasi.

Sub Kultur

Kultur primer epitel usus larva *S. litura* yang sudah menunjukkan *monolayer* dan tidak kontaminasi diambil dan dijadikan sebagai bahan sub kultur. Medium yang masih ada pada cawan terlebih dahulu dibuang dengan cara disedot menggunakan pipet steril. Sel *monolayer* selanjutnya didispersi dengan menggunakan enzim tripsin, digoyang-goyang sambil dilihat di bawah mikroskop *inverted*. Apabila sudah terpisah maka tripsinasi dihentikan dengan cara menambahkan medium yang sudah mengandung serum. Cara dispersi dengan menggunakan tripsin ini ternyata tidak efektif, karena banyak sel rusak. Ketika ditanam kembali ke beberapa cawan ternyata pertumbuhan sel hasil sub kultur sangat lambat. Oleh karena itu dikembangkan cara lain untuk dispersi sel, dan dari beberapa kali uji coba, observasi, dan studi literatur, ternyata sel epitel usus larva *S. litura* ternyata daya lekat sel pada cawan termasuk lemah sehingga untuk melepaskan sel dalam medium dari cawan cukup digoyang-goyang saja. Sel-sel yang sudah lepas selanjutnya ditanam kembali pada beberapa cawan. Satu cawan kultur primer *monolayer* dapat di sub kultur menjadi dua sampai tiga cawan. Sehingga apabila ada 4 cawan kultur primer *monolayer* dapat menjadi 8 sampai 12 cawan sub kultur pertama atau disebut kultur sekunder. Sel sub kultur pertama selanjutnya ditumbuhkan dalam inkubator

dengan suhu 27° C sesuai dengan suhu untuk menumbuhkan kultur primernya. Pertumbuhan sel diamati setiap hari di bawah mikroskop inverted untuk dilihat daya lekat sel, morfologi sel sebelum dan sesudah melekat pada cawan, kemungkinan terjadinya kontaminasi, serta terbentuknya *monolayer*. Apabila sudah terbentuk *monolayer*, maka akan dilakukan sub kultur ke dua dengan cara seperti pada sub kultur pertama. Sub kultur dilakukan sampai tidak mampu lagi untuk di sub kultur kembali.

Inkubasi dan Pengamatan Sel dalam Kultur

Sel-sel dalam cawan kultur dan medium pertumbuhan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 27° C. Setiap hari sel dalam sub kultur diamati di bawah mikroskop *inverted* untuk melihat apakah sel sudah melekat pada cawan kultur dan sudah terjadi pembelahan sel.

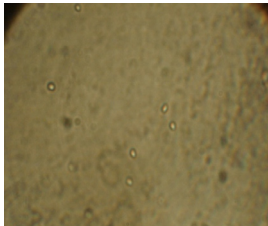
Analisis

Data yang diperoleh meliputi pertumbuhan sel dengan parameter diantaranya daya lekat sel pada cawan, penambahan jumlah sel, kemampuan terbentuknya *monolayer*, serta parameter morfologi sel sebelum dan sesudah melekat pada cawan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis data deskriptif kualitatif.

HASIL

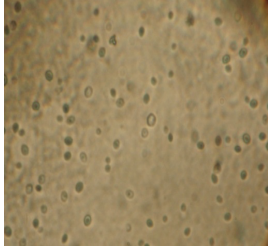
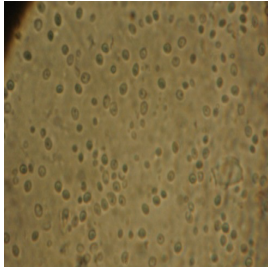


Hasil pengembangan kultur *cell line S. litura* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengamatan pengembangan kultur *cell line S. litura*

No	Parameter pengamatan	Hasil pengamatan
1.	Metode pelepasan sel menggunakan enzim	Sel banyak yang rusak
2.	Metode pelepasan sel dengan cara goyangkan cawan	Sel mudah lepas dari cawan, mudah lepas dari ikatan antar sel, sel tidak banyak yang rusak
3.	Bentuk sel pada awal penanaman pada medium kultur di cawan	Sel berbentuk bulat bercahaya 

dilanjutkan

Lanjutan Tabel 1

No	Parameter pengamatan	Hasil pengamatan
4.	Bentuk sel setelah menempel pada cawan kultur	Sel berbentuk oval, inti terlihat bulat di tengah  Hari ke tiga setelah inokulasi, pertama kali menempel pada cawan  Hari ke-4 setelah inokulasi
5.	Bentuk sel setelah terjadi <i>monolayer</i>	Sel berbentuk <i>polygonal</i> dengan inti bulat di tengah 
6.	Daya lekat sel ke cawan	Kuat, dengan hasil pengamatan sel sudah melekat pada cawan pada hari ke tiga setelah penanaman
7.	Kemampuan membentuk <i>monolayer</i>	Cepat, pada hari ke lima setelah penanaman sel-sel yang dikultur sudah membentuk <i>monolayer</i>
8.	Kemampuan untuk di sub kultur	Dapat di sub kultur sebanyak sepuluh kali
9.	Kontaminan yang sering muncul	Sebagian besar dari golongan jamur 

PEMBAHASAN

Kultur sel primer epitel usus *S. litura* yang sudah membentuk *monolayer* ternyata mudah untuk dilepaskan dari cawan dengan hanya menggoyang-goyangkan cawan, hal ini menunjukkan bahwa ikatan sel pada cawan tidak begitu kuat. Oleh karena itu untuk melakukan sub kultur dari kultur *monolayer* tidak perlu menggunakan enzim untuk melepaskan sel dari cawan karena berdasarkan hasil penelitian dengan menggunakan enzim ternyata dapat merusakkan beberapa sel. Hal ini disebabkan keberadaan enzim berpengaruh kecil dalam membantu melepaskan ikatan sel pada cawan, sehingga keberadaan enzim tersebut lebih berpengaruh pada sel yang dapat merusakkan sel. Keadaan ini berbeda dengan kultur sel *monolayer* golongan vertebrata yang memiliki ikatan yang cukup kuat pada cawan sehingga untuk melepaskan sel-sel pada cawan harus dibantu dengan enzim seperti tripsin. Menurut Midgley *et al.* (1998), sel-sel insekta memiliki daya ikat yang lebih lemah pada cawan kultur sehingga apabila dikultur sel-sel insekta lebih mudah dan lebih cepat berkembang pada kultur suspensi daripada kultur *monolayer*.

Sel-sel *monolayer* dari kultur primer, setelah di sub kultur ternyata mampu melekat dan berkembang menuju *monolayer*. Hal ini menunjukkan bahwa lingkungan untuk pertumbuhan sel yang meliputi medium kultur, pH medium, dan suhu inkubasi sudah sesuai untuk pertumbuhan sel-sel *S. litura*, disamping itu metode yang digunakan selama proses sub kultur sudah benar dan dapat digunakan untuk kultur selanjutnya. Menurut Freshney (2000) lingkungan biak sel sangat penting untuk pertumbuhan sel di dalam cawan kultur, dan lingkungan biak tersebut kondisinya tidak boleh terlalu jauh dengan kondisi secara *in vivo*. Sel-sel yang tidak homogen dalam cawan kultur juga dapat mempengaruhi perkembangan sel karena akan terjadi persaingan makanan, sedangkan dengan keadaan yang homogen dapat menghasilkan pertumbuhan yang baik bagi sel, dan menghasilkan *monolayer* yang bagus serta cepat.

Sel-sel yang baru dikultur, baik pada kultur primer maupun pada sub kultur mempunyai bentuk bulat dan

tampak bercahaya bila dilihat dengan mikroskop *inverted*, sedangkan sel yang sudah melekat bentuknya lonjong dan tidak bercahaya, apabila sudah membentuk *monolayer* berbentuk *polygonal*. Menurut Freshney, (2000) perubahan bentuk sel pada saat dikultur menunjukkan perkembangan biologi sel. Apabila sel sudah membentuk *monolayer*, keadaan sel sangat rapat dan hubungan antara sel satu dengan sel yang lain sangat dekat dan kuat sehingga dapat merubah bentuk sel.

Kemampuan untuk membentuk kultur *cell line* dengan melakukan sub kultur ternyata masih terbatas. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur primer *S. litura* dapat dilakukan sub kultur sampai dengan sepuluh kali, setelah lebih dari sepuluh kali pertumbuhan sel sudah tidak sempurna lagi, sel-sel sulit melekat pada cawan dan pada akhirnya mati, serta terkontaminasi.

Selama beberapa kali sub kultur tidak terlepas dari kontaminasi. Kontaminan yang sering muncul bervariasi. Berdasarkan hasil penelitian, pada saat suhu lingkungan rendah, jamur seringkali muncul sebagai kontaminan. Oleh karena itu yang harus sering dilakukan adalah mempertahankan ruangan *laminar* tetap terjaga sterilitasnya dengan sering melakukan sterilisasi ruangan baik memakai UV maupun bahan kimia.

KEPUSTAKAAN

- Asri, Ducha, Ratnasari E., Pramana, 2004. Perbanyakkan SplMNPV secara *In Vivo* pada Larva *S. litura*. Unesa, Surabaya.
- Freshney RI, 2000. Culture of Animal Cells. A. John Willey & Sons, Inc, Publication, New York.
- Goosen MFA, Daugulis AJ, Faulkner, 1993. Insect Cell Culture Engineering. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Midgley CA, Craig AL, Hite JP, and Thipp TR, 1998. Baculovirus Expression and the Study of the regulation of the Tumor Suppressor Protein: 53, Rapid K and Freshney RI (eds), *DNA Transfer to Culture Cells*. Eiley-liss, New York, 27–54.
- Podgwaite JD, 1985. Viral Insecticides for Biological Control. Academic Press, New York.