

KARAKTERISASI KULTUR MAKROFAG HASIL ISOLASI *Mouse Peritoneum Makrofag* (MPM)

Erna Susanti¹, Retty Ratnawati², Aulanni'am³, Achmad Rudijanto⁴

¹ Akafarma “ Putra Indonesia Malang”, Program Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

² Lab. Ilmu Faal Divisi Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

³ Laboratorium Biokimia, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

⁴ Divisi Endokrin dan Metabolik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

The aims of this study is to determine the MPM isolation techniques, results of the isolation and identification, so it can be used as a reference for the studies using macrophage cell cultures. The most appropriate source for culturing macrophages are the primary culture of MPM. Resident peritoneal macrophages (RPM) is a free-living phagocytic cells in the peritoneal cavity. Millions of resident macrophages can be taken from the mice. The peritoneal cavity is an easy place to harvest the resident macrophages. Identification of macrophages was conducted using flowcytometry with specific marker CD 11B. While the morphology of macrophages in culture was observed microscopically The results of the study showed the average number of macrophages 1.03×10^6 cells / ml were isolated from peritoneal cavity of mice. The result of identification with flowcytometry with marker CD 11 B shows positive results macrophages. While the observation of morphological characteristics of macrophages cultures show the same characteristics as the result of research conducted by Kim in 1997 and Wang et al, 2010 so that it can be concluded that macrophages can be isolated from the peritoneal cavity and can be used as a source of primary cultures of macrophages with good results and can be applied to studies related to the function and activation of macrophages in vitro.

Keyword; Kultur Makrofag, Isolasi Mouse Peritoneum Makrofag (Mpm)

Pendahuluan

Makrofag merupakan fagosit mononuklear yang terdistribusi luas di dalam tubuh. Sel tersebut berperan pada perkembangan, homeostasis dan respon imun alamiah dan adaptif. Fisiologi makrofag dapat berubah tergantung lingkungan dimana makrofag berada serta rangsangan lokal yang terjadi. Makrofag jaringan berasal dari monosit atau dari proliferasi sel yang membentuk koloni makrofag resident. Monosit berasal dari sel progenitor di sumsum tulang yang mengalami tahapan dari monoblast, promonosit dan monosit selanjutnya dilepaskan di sirkulasi. Monosit akan berdeferensiasi menjadi makrofag setelah meninggalkan sirkulasi dan masuk ke jaringan. Di jaringan makrofag dapat teraktivasi dengan adanya rangsangan dan dapat mengubah aktivitas fisiologisnya (Zhang X,dkk., 2008).

Rongga peritoneum merupakan tempat yang mudah untuk memanen makrofag resident yang belum mengalami manipulasi. Untuk meningkatkan jumlah makrofag dapat dilakukan dengan jalan diberikan penginduksi steril seperti Brewer thioglycolate Broth atau

pepton protease yang diinjeksikan ke rongga peitoneum sebelum sel dipanen. Bahan tersebut dapat meningkatkan migrasi monosit ke dalam rongga peritoneum. Dengan induksi thioglikolat akan didapatkan paling tidak 5 sampai 6 kali jumlah makrofag tanpa diinduksi (Zhang X,dkk., 2008).

Sumber yang paling sesuai untuk kultur makrofag adalah kultur primer dari makrofag tikus. *Resident Peritoneal Makrofag* (RPM) merupakan sel fagosit yang hidup bebas pada rongga peritoneal. Jutaan *resident* makrofag dapat diambil dari satu mencit. Jumlah sel yang banyak dapat dihasilkan dengan menginjeksi bahan penginduksi inflamasi steril seperti thioglycollate atau Bio-Gel polyacrylamide ke dalam rongga peritoneal. Makrofag yang didapatkan diperkirakan lebih mature daripada *resident* makrofag, dan monosit yang diambil dari darah. Untuk eksperimen dapat digunakan makrofag yang teraktivasi dengan cara menginduksi bahan stimulasi inflamasi misalnya *Mycobacterium bovis* Bacillus–Calmette–Guerin (BCG), strain Pasteur. Pemurnian makrofag dari cairan peritoneal

mudah dilakukan menggunakan kemampuan makrofag untuk melekat pada kultur jaringan plastik. Adesi makrofag membutuhkan sejumlah reseptor penting seperti *scavenger receptor* (SR) dan *reseptor komplemen tipe 3* (CR-3) (Davies JQ dan Gordon S, 2006).

Untuk studi dan penelitian dengan kultur makrofag selain dapat diperoleh dari hasil isolasi dari makrofag peritoneal dapat diisolasi dari *murine bone marrow* serta *human monosit derived makrofag*. Bone marrow adalah sumber baik makrofag *mature* maupun prekursor makrofag. Dalam jumlah besar makrofag dapat diambil dari bone marrow dengan mengambil sel *immature* dari femur tikus dan mengkultur dengan spesifik *growth factors*. Cara ini menghasilkan sel dengan populasi yang homogen dan sering dianggap lebih mudah dibandingkan dengan proses

isolasi secara khusus dari *Resident Bone Marrow Cells* (RBMM) dengan cara mekanik dan enzimatis (Davies JQ dan Gordon S, 2006).

Human makrofag paling sering diambil dengan memurnikan monosit darah pada sirkulasi yang selanjutnya secara *in vitro* akan berdeferensiasi menjadi makrofag *mature*. Sel darah putih dengan perbedaan densitas akan dapat dipisahkan dengan sentrifugasi. Monosit dipisahkan dari limfosit dengan melekatkan pada kultur jaringan atau dengan gelatin yang *dicoated* pada tempat kultur yang akan mendapatkan kemurnian antara 90 -95% (Davies JQ dan Gordon S, 2006).

Untuk memeriksa tingkat kemurnian kultur sel yang kita dapatkan dapat ditentukan dengan menggunakan marker spesifik untuk sel makrofag yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Penanda Antigen Makrofag

Marker ^a	Species ^b	Clone	Supplier/reference
CD68 (macrosialin)	Mouse	FA-11	Serotec/ref. 5
CD11b (CR-3)	Mouse	5C6	Serotec
CD18	Mouse	C71/16	Serotec
CD14	Mouse	rmC5-3	PharMingen
MHC II	Mouse	TIB120	ATCC
CD32	Mouse	2.4G2	PharMingen
F4/80	Mouse	F4/80	Serotec
SR-A (scavenger receptor)	Mouse	2F8	Serotec
Sialoadhesin	Mouse	3D6.113	Serotec
Mannose receptor	Mouse	MR5D3	Serotec/ref. 6

(Sumber: Davies and Gordon, 2006)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tehnik isolasi MPM, hasil isolasi serta identifikasinya sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian yang menggunakan kultur sel makrofag.

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari sampai dengan Maret 2015. Penelitian ini telah mendapatkan kelayakan etik penelitian dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Bahan dan Cara Kerja

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Mencit BABL/C yang memenuhi kriteria usia 6-8 minggu dan bebas patogen. Bahan yang digunakan Medium RPMI, *Phosphat Buffer Saline* (PBS) tanpa

Calcium dan Magnesium, medium komplit makrofag.

Isolasi *Mouse Peritoneum Makrofag* (MPM) dan kultur makrofag dilakukan dengan prosedur sebagai berikut : mencit dimatikan dengan dislokasi tulang leher atau dengan pemberian chloroform kemudian bagian abdomen disemprot dengan alkohol 70 %. Bagian abdomen dibedah bagian kulit luar dan disterilisasi dengan alkohol 70 %, kemudian sejumlah 10 ml medium RPMI dingin diinjeksikan dengan menggunakan jarum 19 G ke lapisan peritonium. Abdomen ditepuk- tepuk selama 10 detik lalu diambil cairan peritonium dengan menggunakan jarum 25G. Konsentrasi makrofag yang digunakan sekitar 10⁶sel / ml dimasukkan dalam tiap mikroplate 24 well yang berisi cover slip kemudian ditambahkan

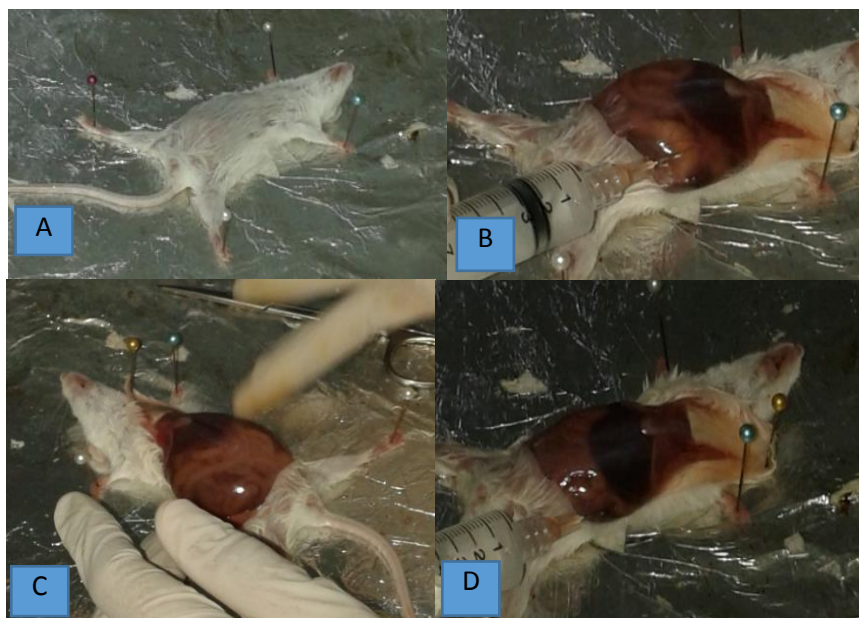
medium kompleks 200µl dan diinkubasikan pada inkubator CO₂ 5% selama 2 jam pada suhu 37°C, sel yang tidak melekat dibuang sedangkan sel yang melekat dicuci dengan medium RPMI sebanyak 1 kali. Setelah dicuci ditambahkan medium komplet ke dalam tiap mikrolate 24 well sebanyak 500 µl dan diinkubasi kembali pada inkubator CO₂ 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam kultur makrofag siap digunakan (Reni S, dkk., 2010).

Untuk Identifikasi Makrofag dengan Marker CD 11 B Fluositometry dilakukan cara sebagai berikut; Suspensi sel hasil isolasi makrofag peritoneum ditambahkan antibodi CD 11B FITC 0,5 µl didiamkan 20 menit di ruang gelap. Selanjutnya ditambahkan sel staining buffer PBS 2 % dalam FBS sebanyak 30 µl dimasukkan appendorf dan dicek dengan flowsitometri.

Data yang didapat dari penelitian ini berupa data kualitatif berupa morfologi makrofag hasil kultur dari MPM dan hasil flowsitometri.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan penelitian Wang *et al*, 2008 tentang karakterisasi murin makrofag dari bone marrow, spleen dan peritoneum mendapatkan temuan bahwa *Peritoneum Macrophage* (PMs) menunjukkan makrofag yang lebih matur dibandingkan dengan *Spleenic Macrophage* (SPMs) dan *Bone Marrow Macrophage* (BMs). PMs memiliki ekspresi MHCII dan CD 86 dalam jumlah tinggi. MHC II dan CD 86 diekspresikan tinggi pada makrofag yang telah berfungsi sempurna yang menunjukkan maturitasnya. Sedangkan CD 115 dan GR 1 umumnya diekspresikan oleh monosit maupun makrofag yang belum mengalami diferensiasi dan makrofag immature.[wang, 27,28]. Dibandingkan dengan kultur sel dari *cell line* seperti J 774A1, RAW 264.7, P388D1, U937 kultur sel dari kultur primer dari BMs, PMs dan SPMs lebih umum digunakan karena kultur *cell line* memiliki kekurangan ketika dilakukan subkultur secara terus menerus akan menyebabkan *gene loss* dan merusak fungsi imun makrofag. Untuk mendapatkan kultur MPM diperlukan tahapan isolasi yang tepat sehingga didapatkan makrofag dalam jumlah yang diharapkan. Adapun tahapan isolasi makrofag dari peritoneum mencit dapat dilihat pada gambar 1.



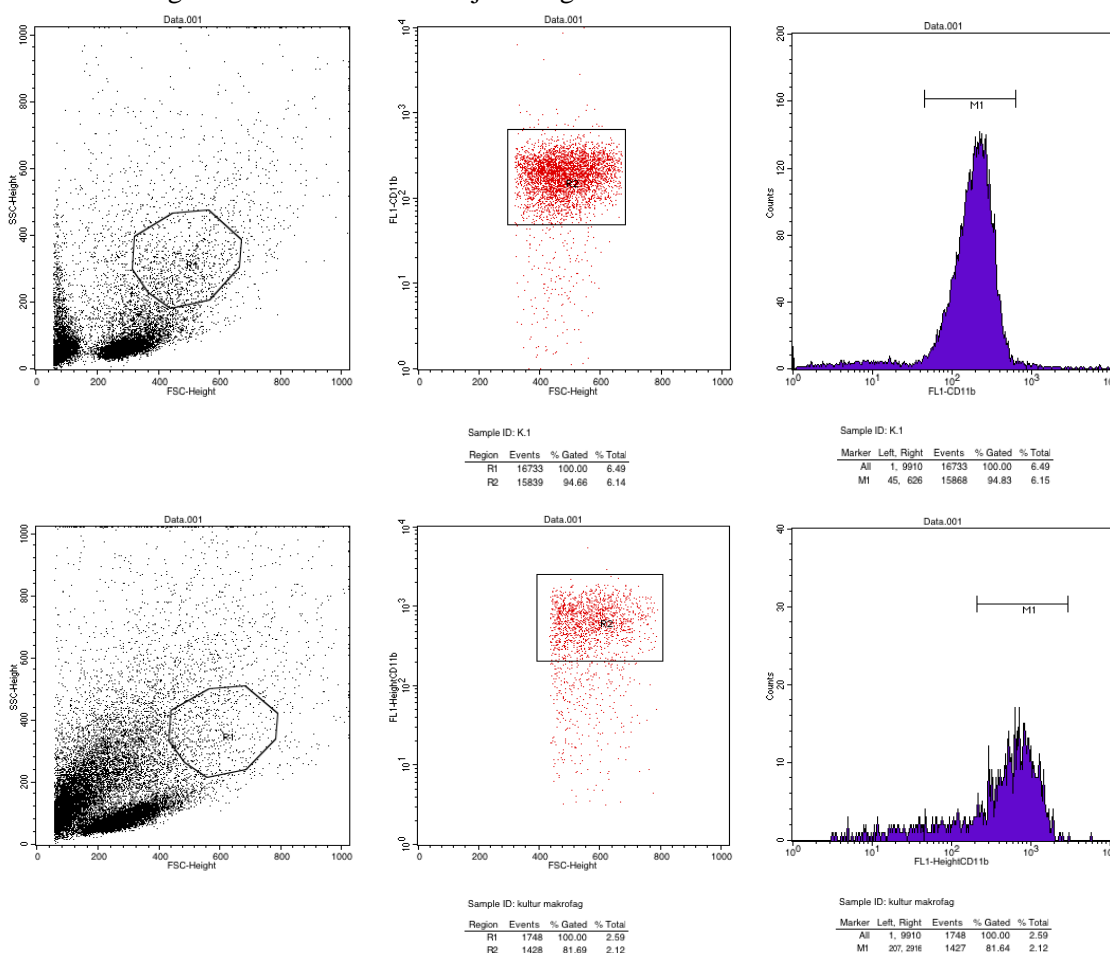
Gambar 1: A) Mencit yang telah dieutanasia dan siap dibedah bagian kulit luar abdomen ;b) Menginjeksikan RPMI dingin ke rongga peritoneum; c) abdomen ditepuk- tepuk selama 10 detik; d) cairan peritoneum diambil.

Untuk menentukan jumlah sel hasil isolasi diukur dengan hematositometer dengan hasil sebagaimana terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Jumlah sel makrofag hasil perhitungan dengan hematositometer

Mencit ke-	Jumlah Sel Makrofag
1	1,19 x 10 ⁶ sel/ ml
2	1,04 x 10 ⁶ sel/ ml
3	0,85 x 10 ⁶ sel/ ml
4	1,10 x 10 ⁶ sel/ ml
5	0,98 x 10 ⁶ sel/ ml
Rata- rata	1,03 x 10 ⁶ sel/ ml

Berdasarkan jumlah sel rata – rata yang didapatkan menunjukkan bahwa hasil isolasi makrofag sesuai dengan pustaka yang ada. Menurut Cohn, 1978, Fortier *et al.*, 1982 umumnya jumlah makrofag yang dapat diisolasi dari makrofag berkisar antara 0.5–1 × 10⁶ makrofag tiap mencit.^[4,5] Untuk membuktikan apakah hasil isolasi dari rongga peritoneum tersebut sel makrofag atau bukan dilakukan identifikasi dengan marker CD 11B. Adapun hasil identifikasi makrofag secara flowsitometri dengan marker CD 11B ditunjukkan gambar 2.



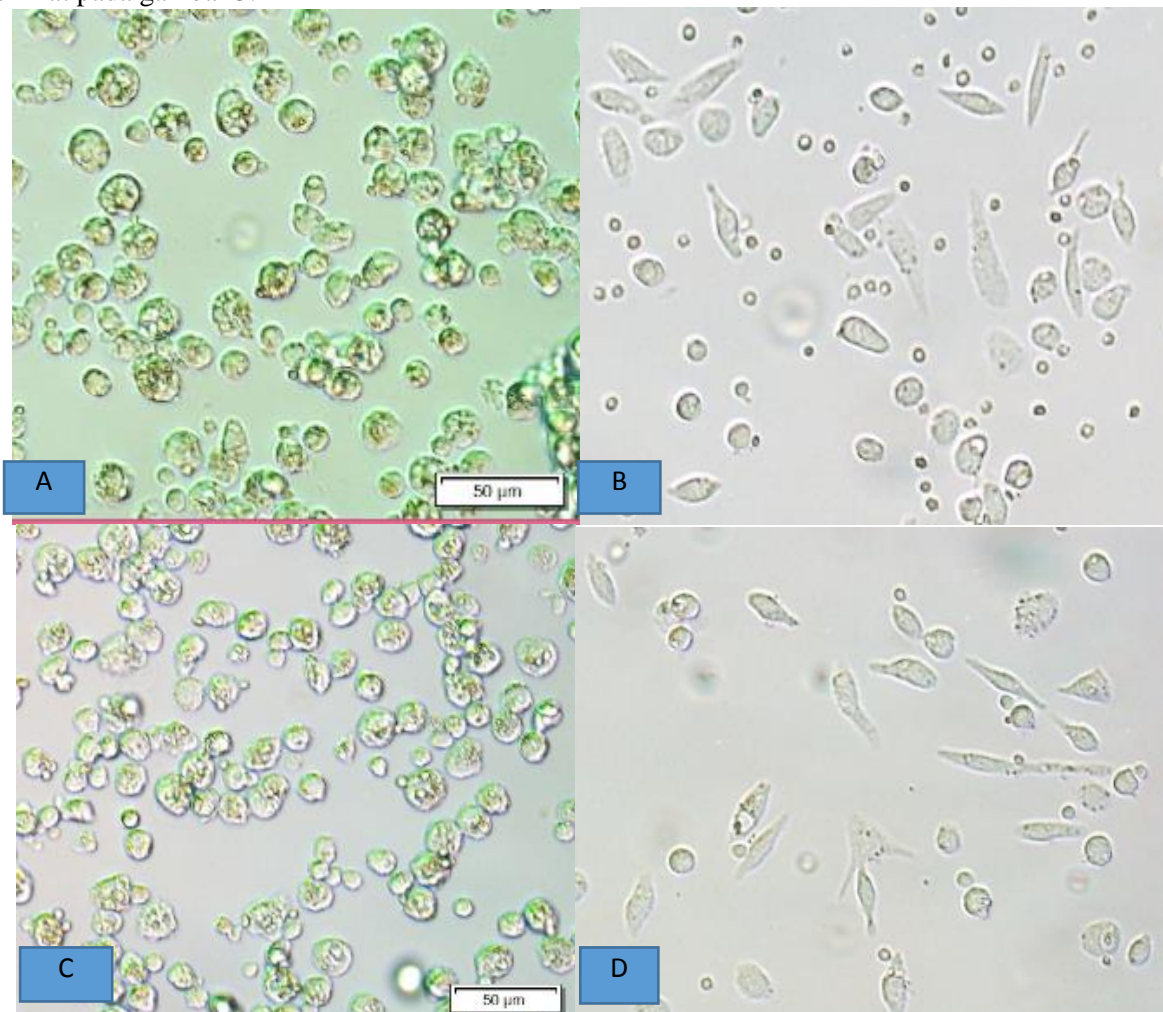
Gambar 2. Hasil identifikasi makrofag marker CD 11 B dengan flowsitometri.

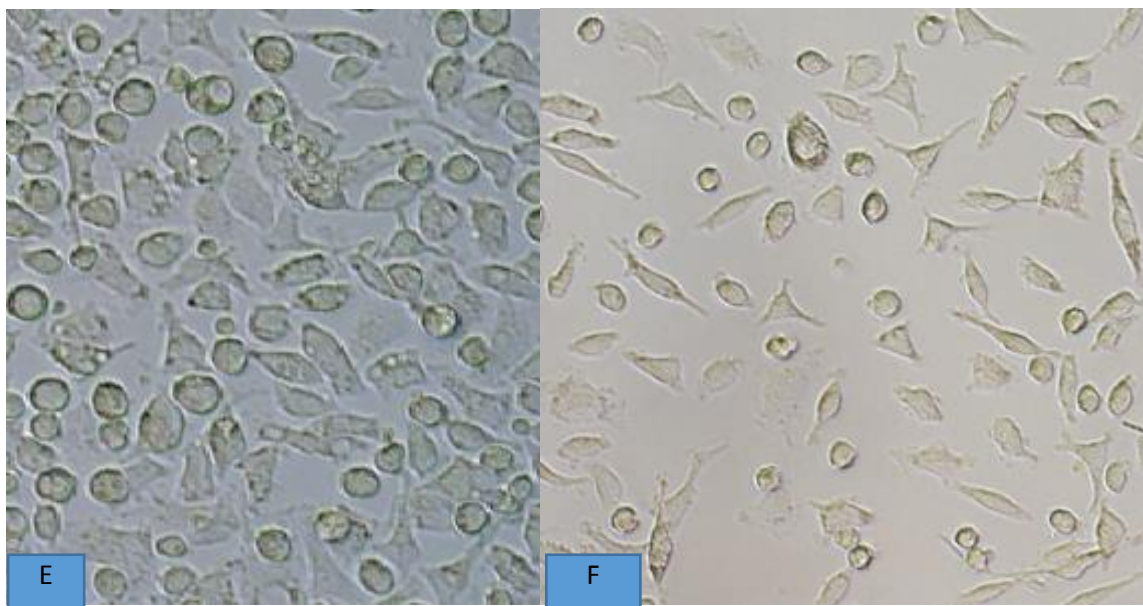
Karakterisasi makrofag dengan fluoresensi menggunakan monoklonal antibodi yang terlabel yang secara spesifik mengenali protein yang diekspresikan oleh makrofag. Penanda permukaan dapat digunakan untuk membedakan makrofag dengan sel lainnya dalam populasi sel yang heterogen. Flowsitometri dapat mengidentifikasi dan memilah sel yang dikehendaki dalam populasi sel yang heterogen. CD 11B merupakan salah satu marker spesifik untuk mengidentifikasi makrofag sebagaimana terlihat pada tabel 3 (Kim J, 1997).

Tabel 3. Antibodi Monoklonal Yang Umum Digunakan Untuk Karakterisasi Makrofag

Antibody	Clone	Cell type	Reference
Anti-F4/80	BM8	Macrophages	McGarry and Stewart (1991)
Anti-CD11b (Mac-1 beta chain)	M1/70	Macrophages	Ho and Springer (1982)
Anti-CD68 (macrosialin)	FA-11	Macrophages	Rabinowitz and Gordon (1991)

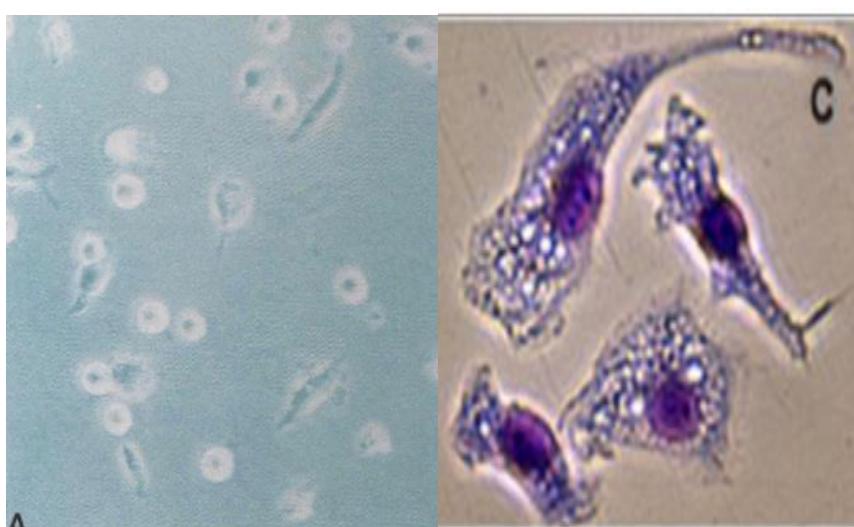
Untuk membuktikan kultur yang dilakukan benar-benar kultur makrofag atau sel lain dilakukan pengamatan karakteristik morfologi kultur makrofag dari hasil isolasi MPM sebagaimana terlihat pada gambar 3.





Gambar 3. Hasil morfologi kultur makrofag : a) kultur makrofag hari 1; b) kultur makrofag hari ke-1 setelah dicuci ; c,d) replikasi ke -2 kultur makrofag pada hari ke 1 sebelum dan setelah pencucian; e, f) Replikasi ke -3.

Dibandingkan dengan kajian pustaka , penelitian Kim 1997 menunjukkan karakteristik morfologi yang sama dengan hasil penelitian yang telah dilakukan. Sejalan juga dengan penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al*, 2010 sebagaimana terlihat pada gambar 4 (Wang C, dkk., 2013).



Gambar 4. Hasil penelitian Kim, 1997 dan Wang *et al* 2010 karateristik morfologi MPM.

KESIMPULAN :

1. Makrofag dapat diisolasi dari rongga peritoneum dengan hasil rata rata $1,03 \times 10^6$ sel/ ml.
2. MPMs dapat digunakan sebagai sumber kultur primer makrofag berdasarkan hasil identifikasi dengan flowsitometri dengan marker CD 11B dan hasil karakteristik morfologi kultur dengan hasil yang baik dan dapat diaplikasikan

untuk penelitian- penelitian yang berhubungan dengan fungsi dan aktivasi makrofag secara in vitro.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Dirjen Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Disertasi Doktor Tahun 2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Zhang X, Goncalves R, Mosser D, 2008, The Isolation and Characterization of Murine Macrophages, *Curr Protoc Immunol*. Chapter: Unit-14.1.p. 8
- Davies JQ, Gordon S, 2006. Methods in Molecular Biology, vol. 290: Basic Cell Culture Protocols, Third Edition, Edited by: C. D. Helgason and C. L. Miller Humana Press Inc., Totowa.
- Reni S, Sumarno, Widjajanto E, 2010, Susu kuda Sumbawa meningkatkan respon imun seluler makrofag peritoneal mencit terhadap Salmonella typhimurium, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol XXVI. No.1.
- Cohn Z., 1978, The Activation of Mononuclear Phagocytes: Fact, Fancy, and Future. *J. Immunol*, 121:813-816.
- Fortier AH, Hoover DL, Nacy CA., 1982, Intracellular replication of *Leishmania tropica* in mouse peritoneal macrophages: Amastigote infection of resident cells and inflammatory exudate macrophages. *Infect. Immun*, 38:1304-1308
- Kim J, Keshava C, Murphy A, Pitas R, Parthasarathy S, 1997, Fresh mouse peritoneal macrophages have low scavenger receptor activity, *Journal of Lipid Research*, Volume 38, 1997
- Wang C, Yu X, Cao Q, Wang Y, Zheng G, Tan T, Zhao H, Zhao Y, Wang Y, Harris D, 2013, Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum, *BMC Immunology* 14:6.
- Wang Y, Cui X, Tai G, Ge J, Li N, Chen F, Yu F, Liu Z: A critical role of activin A in maturation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Cell Mol Immunol* 2009, 6:387-392.
- Andreesen R, Brugger W, Scheibenbogen C, Kreutz M, Leser HG, Rehm A, Lohr GW: Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 1990, 47:490-497