

ISOLASI *PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS* (PBMCs) DARI DARAH MANUSIA SEHAT DENGAN METODE SENTRIFUGASI GRADIEN FICOLL

Siti Warnasih¹, W. Yulia², B. Yohan³, I.M. Artika⁴, R.T. Sasmono⁵

¹Program Studi Kimia, FMIPA, Universitas Pakuan

²Faculty of Medicine, Syiah Kuala University, Aceh, 23111, Indonesia

^{3,4,5}Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta, 10430, Indonesia

Email : siti.warnasih11@gmail.com

ABSTRACT

Peripheral blood sel mononuclear cell (PBMC) is a white blood cell that can be isolated using the gradient centrifugation method. Ficoll is a reactant which can be used in this method because it produce a high viability i.e. $97.1\% \pm 1.0\%$. This research aims to isolate PBMC from healthy human blood. PBMC's result is used for analysis of dengue virus immune response. Dengue viruses infect PBMC, so going on the secretion of cytokine which is one marker of severity of dengue disease. Expression of cytokines can be measured using quantitative real-time reverse transcription – polymerase chain reaction (qRT-PCR). Venous blood from healthy human is taken aseptically using anticoagulants heparin, then PBMC is isolated with ficoll gradient centrifugation method to produce buffy coat that contain PBMC. Viability of PBMC is calculated using hemocytometer with the help of a microscope. Based on the results obtained by PBMC isolation per mL of venous blood that is $2,08 \times 10^6$ up to $2,61 \times 10^6$ with an average of $2,31 \times 10^6$ with viability of 95-99%. These results indicate that this method is quite effective in isolating PBMC from healthy human blood.

Keyword : *blood, ficoll, centrifugasi gradien, PBMCs*

PENDAHULUAN

Penyakit dengue ialah penyakit yang disebabkan oleh virus dengue yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Gubler, 1998). Virus dengue dapat bereplikasi dalam darah khususnya sel mononuklear/PBMC sehingga akan terjadi suatu respon imun (Kou *et al.* 2008; Sun *et al.* 2013).

PBMC merupakan sel darah putih yang memiliki inti tunggal berbentuk bulat, terdiri atas sel limfosit T, sel limfosit B, sel *natural killer* (NK), dan monosit (Delves *et al.* 2006). Sel-sel ini merupakan komponen penting dari sistem kekebalan tubuh yang terlibat dalam imunitas humoral dan seluler. Sel mononuklear banyak digunakan dalam penelitian dan aplikasi klinis seperti dalam bidang mikrobiologi, virologi, onkologi,

pengembangan vaksin, transplantasi dan biologi regeneratif, dan toksikologi.

Salah satu cara pemisahan PBMC dari komponen-komponen lain pada darah adalah menggunakan metode sentrifugasi gradien. Prinsip sentrifugasi didasarkan atas fenomena bahwa partikel yang tersuspensi di dalam suatu wadah (tabung atau bentuk-bentuk lain) akan mengendap ke dasar wadah karena pengaruh gravitasi. Laju pengendapan tersebut dapat ditingkatkan dengan cara meningkatkan pengaruh gravitasional terhadap partikel. Hal ini dapat dilakukan dengan menempatkan tabung berisi suspensi partikel ke dalam rotor suatu mesin sentrifugasi kemudian diputar dengan kecepatan tinggi (Yuwono, 2010).

Percoll dan ficoll merupakan media yang dapat digunakan pada sentrifugasi gradien untuk isolasi PBMC. Percoll terdiri

Isolasi *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) (Siti Warnasih, dkk.)

dari partikel-partikel silika yang dilapisi PVP (*polyvinyl pyrrolidone*) yang mempunyai densitas 1,130 g/mL (Almeida *et al.* 2000). Ficoll berupa larutan yang mengandung polisukrosa dan natrium diatrizoat yang mempunyai densitas 1,077 g/mL. (Graham 2002; Bahunde *et al.* 2013; Healthcare 2014). Fungsi natrium diatrizoat adalah untuk mengoptimalkan densitas dan osmolaritas sehingga pemisahan sel-sel lebih efisien. Penelitian Chang *et al.* tahun 2009 yang mengisolasi hMSCs (*human Mesenchymal Stem Cells*) dari sumsum tulang menyatakan bahwa penggunaan ficoll menghasilkan *yield* yang lebih banyak dibandingkan jika menggunakan percoll.

Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi PBMC dari darah manusia sehat menggunakan metode sentrifugasi gradien ficoll. PBMC hasil isolasi kemudian akan digunakan pada penelitian selanjutnya untuk analisis respon imun virus dengue.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sel PBMC berasal dari manusia sehat. Pengambilan darah vena dilakukan secara aseptik. Medium yang digunakan adalah 1X RPMI 1640 mengandung 2mM *L-glutamine* dan disuplementasi 2% (v/v) *Fetal Bovine Serum*/FBS, 100U/mL *Penicillindan* 100µg/mL *Streptomycin* [Gibco-Invirogen]. Bahan lain adalah ficoll [Histopaque, Sigma Aldrich]; 1X 0,25% Tripsin-EDTA [Gibco], 1X *Dulbeccos Phosphate Buffer Saline* (D-PBS) pH 7,4 tanpa CaCl₂ dan MgCl₂ [Gibco], *trypan blue* [Sigma]; 70% etanol [Merck]; dan 10% *bleach* [Vesphene].

Metode

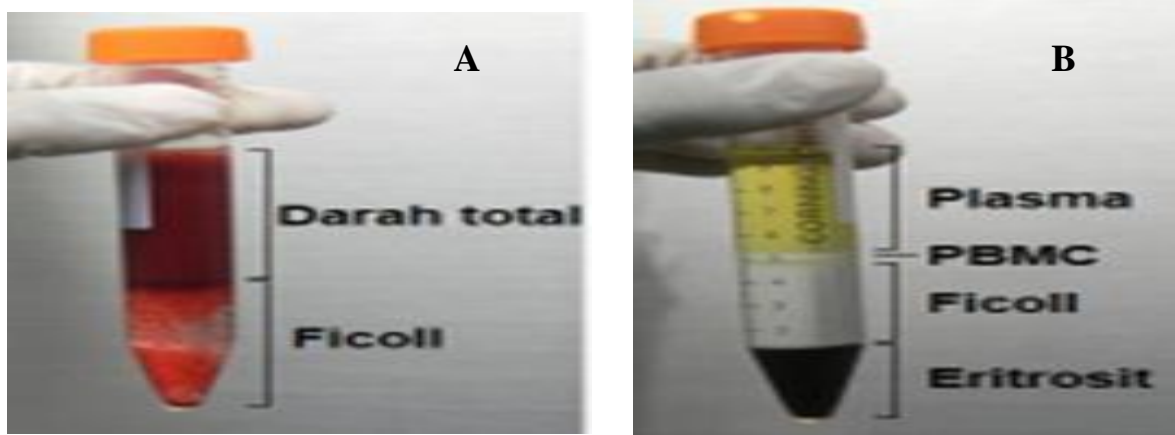
Metode isolasi PBMC berdasarkan pada Bahunde *et al.* 2013 yang telah dimodifikasi. Darah vena donor sehat diambil secara aseptik (daerah yang akan diambil darah dibersihkan dengan alkohol dan pengambilan darah menggunakan Isolasi *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs)

(Siti Warnasih, dkk.) dan dengan penambahan antikoagulan heparin dalam tabung Vacuette. Darah diencerkan dengan 1X D-PBS pH 7,2 dengan perbandingan 1:1 dalam tabung sentrifugasi 50mL dan dihomogenisasi. Lalu dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi baru dan ditambahkan larutan ficoll sebanyak 1:1 menggunakan spuit sehingga terbentuk dua fase cairan. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 400 xg pada suhu 20°C selama 40 menit pada alat *refrigerated centrifuge* tipe Universal 320R. Bagian *buffy coat* yang berisi PBMC diambil dengan menggunakan pipet transfer kapasitas 3 mL. PBMC dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi baru dan dilakukan pencucian menggunakan 1X D-PBS pH 7,2 sebanyak 3 kali volume *buffy coat* yang didapat dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 300 x g, 4°C selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang. Proses tersebut diulang hingga 2 kali. Jumlah sel PBMC dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* dan viabilitas sel PBMC ditentukan menggunakan pewarnaan *trypan blue*. Sel PBMC dikultur didalam tabung sentrifugasi 15 mL dalam medium 1X RPMI 1640 dengan suplementasi 10 % FBS, 2 mM *L-glutamin*, 100 U/mL Penisilin, dan 100 µg/mL Streptomisin diinkubasi pada suhu 37°C, 5% CO₂.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum isolasi PBMC dilakukan, agar sampel darah tidak menggumpal maka perlu ditambahkan antikoagulan. Heparin, EDTA, sitrat, *acid citrate dextrose* (ACD), dan *citrate phosphate dextrose* (CPD) dapat digunakan sebagai antikoagulan untuk sampel darah (Boyum, 1976). Pada penelitian ini antikoagulan yang dipakai adalah heparin. Hal ini karena antikoagulan heparin tidak mempengaruhi morfologi sel yang ada dalam darah, yaitu eritrosit, trombosit, maupun leukosit yang merupakan target isolasi.

..... (Siti Warnasih, dkk.)



Gambar1. Proses isolasi PBMC dengan menggunakan metode sentrifugasi gradient ficoll. A. Sebelum dilakukan sentrifugasi, B. Telah dilakukan sentrifugasi.

Isolasi PBMC dilakukan menggunakan metode sentrifugasi gradient ficoll (Gambar1). Metode sentrifugasi gradien ficoll merupakan metode pemisahan berdasarkan pada perbedaan densitas. Proses sentrifugasi menghasilkan bagian cincin yang putih keruh disebut dengan *buffy coat* yang berisi sel PBMC. *Buffy coat* terletak diantara plasma dan ficoll. Eritrosit yang mempunyai densitas yang besar berada di lapisan paling bawah, sedangkan plasma yang berdensitas kecil berada di lapisan paling atas.

Sel PBMC yang didapat dari hasil isolasi kemudian dihitung jumlah dan viabilitasnya menggunakan hemositometer dan pewarnaan *trypan blue*. Di dalam hemositometer terdapat 10 kamar hitung dan seluruh sel yang terdapat di dalam kamar hitung tersebut dijumlahkan. Sel yang berwarna putih merupakan sel yang hidup atau viabel, sedangkan yang berwarna biru adalah sel yang mati. Untuk mengetahui persentasi viabilitas sel, dilakukan perhitungan dengan membandingkan jumlah sel yang berwarna putih dibandingkan dengan total sel yang ada. Isolasi darah menggunakan metode sentrifugasi gradient ficoll memungkinkan untuk mendapatkan sel PBMC yang dapat digunakan untuk analisis mengenai system imun. Sel PBMC yang dihasilkan diinfeksi

oleh virus dengue, yang mengakibatkan terjadinya respon, yaitu adanya sekresi sitokin (Noisakran *et al.* 2010; Kou *et al.* 2008). Sitokin merupakan protein sistem imun yang mengatur interaksi antar sel dan memacu reaktivitas imun, baik pada imunitas bawaan maupun adaptif. Sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi atau perantara dalam komunikasi antar sel yang sangat poten. Jadi sitokin berperan dalam aktivasi sel. B, monosit, makrofag, inflamasi dan induksi sitotoksitas (Abbas *et al.* 2012). Produksi sitokin yang terjadi akibat infeksi virus dengue pada sel imun memiliki kontribusi pada terjadinya manifestasi klinis penyakit.

Hasil perhitungan jumlah PBMC yang didapat dari enam kali isolasi darah vena manusia didapatkan hasil isolasi berkisar antara $2,08 \times 10^6$ hingga $2,61 \times 10^6$ dengan rata-rata yaitu $2,31 \times 10^6$ PBMC/mL darah vena dengan viabilitas 95-99%. Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan untuk mengisolasi PBMC dari darah manusia sehat sangat efektif, sesuai dengan penelitian Nilsson *et al.* 2008 yang menyatakan jumlah PBMC darah vena manusia sekitar $1,27 \pm 0,4$ juta sel/mL darah yang diisolasi menggunakan sentrifugasi gradien ficoll dengan viabilitas $97,1 \% \pm 1,0 \%$.

Isolasi *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) (Siti Warnasih, dkk.)

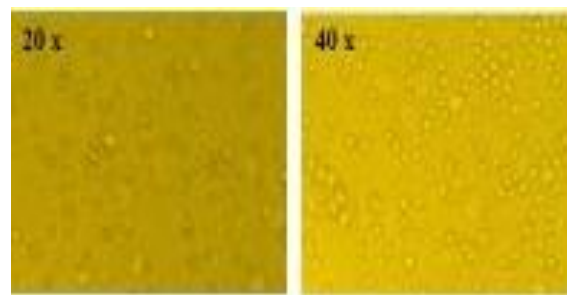
Tabel 1.Hasil perhitungan jumlah PBMC

Percobaan	Volume darah vena (mL)	Sel PBMC per mL darah (PBMC/mL)	Viabilitas (%)
1	25	2,17 x 10 ⁶	95
2	50	2,08 x 10 ⁶	97
3	60	2,61 x 10 ⁶	96
4	70	2,37 x 10 ⁶	98
5	100	2,42 x 10 ⁶	97
6	150	2,20 x 10 ⁶	99
Rata-rata		2,31 x 10⁶	97

Hal iniseperti yang sudah pernahd ilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya bahwa prosedur isolasi ini memiliki angka viabilitas sel yang konsisten dan cukup reproduktif (Nilsson *et al.* 2008; Bahunde et al. 2013). Percobaan untuk mendapatkan jumlah PBMC yang optimal dilakukan beberapa kali dengan hasil yang terlihat pada Tabel 1.

Morfologi PBMC hasil isolasi menggunakan mikroskop cahaya ditampilkan pada Gambar 2. Berdasarkan hasil tersebut didapatkan PBMC yang berbentuk bulat seperti bola dan bersel tunggal. Hasil ini sesuai dengan yang dikemukakan Delves *et al.* 2006.

PBMC manusia terdiri atas 70 % sellimfosit T, 15 % limfosit B, 10 % sel*natural killer* (NK), 5 % monositdan 1 % sel dendritik (Delves *et al.* 2006). Secarain *vitro*, makro fag bias diperoleh dengan mengisolasi monosit dari PBMC yang jumlahnya sekitar 5 % dari sel tersebut. Makrofag yang di diferensiasi secara *in vitro* biasad isebut dengan *monocyte derived macrophages* (MDM). Sel PBMC dan MDM adalah sel imun yang merupakan target awal infeksi virus dengue (Warke *et al.*2003; Kou *et al.* 2008; Becerra *et al.* 2009).



Gambar 2. Morfologi PBMC dengan mikroskop cahaya pembesaran lensa objektif 20x dan 40x

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode sentrifugasi gradien ficoll sangat efektif digunakan untuk mengisolasi PBMC dari darah manusia sehat. Jumlah PBMC yang dihasilkan pun cukup banyak, sehingga dapat digunakan untuk keperluan analisis respon imun virus dengue.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Laboratorium Dengue, Lembaga Biologi Molekuler ijkman.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Cellularand Molecular Immu nology. 7thed. United States of America: Elsevier.

- Almeida, M.C., Silva, A.C., Barral, A., Netto, M.B. 2000. A simple Method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95(2):221-223.
- Bahunde, F., Awoyode, R., Fields, B., McLean, P., Tambwe, C., Johnson, N. 2013. Creating Evidence-based Procedures Out of Established Processes: Validation of Ficoll-Plaque™ Centrifugation for Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells. In Precision Bioservices, Inc. Frederick. MD Viability and Purity of Cell.
- Beccera, A., Warke, R.V., Martin, K., Khaja, K., de Bosch, N., Rothman, A.L., Bosch, I. 2009. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. *J Med Virol.* 81(8):1403-1411.
- Boyum, A., Scand.1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *J ImmunolSuppl.* 5: 9–15.
- Chang, Y., Hsieh, P-H., Chao, C.C-K. 2009. The efficiency of percoll and ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Med J.* 32(3): 264-274.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., Roitt, I.M. 2006. *Roitt's Essential Immunology.* 11th ed. Blackwell Publishing.
- Graham JM. 2002. Isolation of peripheral blood mononuclear cells from macaques on a density barrier. *The Scientific World Journal* 2:1654–1656.
- Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews.* 11(3):480-498.
- Healthcare GE. 2014. Isolation of mononuclear cells; Methodology and applications. GE Healthcare.
- Kou, Z., Quinn, M., Chen, H., Rodrigo, W.W., Rose, R.C., Schlesinger, J.J., Jin, X. 2008. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med. Virol.* 80: 134-146.
- Nilsson, C., Aboud, S., Karlén, K., Hejdeman, B., Urassa, W., Biberfeld, G. 2008. Optimal Blood Mononuclear Cell Isolation Procedures for Gamma Interferon Enzyme-Linked Immuno spot Testing of Healthy Swedish and Tanzanian Subjects. *Clinical and Vaccine Immunology.* 15(4):585-589.
- Noisakran, S., Onlamoon, N., Songprakhon, P., Hsiao, H-M., Chokephaibulkit, K., Perng, G.C. 2010. Cells in dengue virus infection *in vivo.* *Adv Virol.* Article ID 164878, 15 pages.
- Sun, P., Kochel, T.J. 2013. The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis. *Sci World J.*
- Warke, R.V., Khaja, K., Martin, K.J., Fournier, M.F., Shaw, S.K., Brizuela, N., *et al.* 2003. Dengue virus induces novel change in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol.* 7(21): 11822-11832.
- Yuwono, T. 2010. *Biologi Molekuler.* Jakarta: Erlangga