

KONSENTRASI, KEMURNIAN, DAN VIABILITAS SEL LEYDIG HASIL PURIFIKASI DENGAN GRADIEN NYCODENZ DAN KULTUR *IN VITRO*

Concentration, Purity, and Viability of Leydig Cells after Purification Using Nycodenz Gradient and In Vitro Culture

Ekayanti M. Kaiin¹, Ita Djuwita², Tuty L. Yusuf³, dan M. Agus Setiadi³

¹Bidang Biologi Sel dan Jaringan Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta

²Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: ekakaiin@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan isolasi dan purifikasi sel Leydig dengan menggunakan gradien Nycodenz untuk meningkatkan jumlah perolehan sel Leydig yang hidup setelah purifikasi dan kultur. Isolasi dan purifikasi sel Leydig dilakukan dengan perlakuan gradien Nycodenz 3 kolom (5, 10, dan 15% sebagai Nycodenz I) dan 5 kolom (4, 8, 10, 12, dan 15% sebagai Nycodenz II) serta gradien Percoll 5 kolom (21, 26, 34, 40 dan 60%) sebagai kontrol. Parameter yang diamati adalah konsentrasi, kemurnian, dan viabilitas sel Leydig setelah isolasi dan purifikasi serta kultur *in vitro*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolasi dan purifikasi sel Leydig dengan gradien Nycodenz (I dan II) secara nyata ($P < 0,01$) menghasilkan konsentrasi sel yang lebih rendah dibandingkan dengan gradien Percoll. Namun penggunaan gradien Nycodenz II cenderung menghasilkan kemurnian sel yang lebih tinggi (91,40%) dibandingkan dengan Nycodenz I (85,53%). Hasil tersebut tidak berbeda nyata dibandingkan dengan gradien Percoll (92,20%). Viabilitas sel Leydig pada semua perlakuan hampir sama yaitu 98%. Namun demikian, setelah dikultur selama 3 hari, konsentrasi sel Leydig pada perlakuan Percoll ($2,44 \times 10^6$ sel/ml) dan Nycodenz I ($3,21 \times 10^6$ sel/ml) secara statistik ($P < 0,05$) lebih rendah dan dibandingkan dengan Nycodenz II ($3,88 \times 10^6$ sel/ml), sedangkan viabilitas sel Leydig setelah dikultur pada gradien Nycodenz I (90,00%) dan Nycodenz II (91,17%) secara sangat nyata ($P < 0,01$) menghasilkan viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan gradien Percoll (82,30%). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa penggunaan gradien Nycodenz II efektif untuk mempurifikasi sel Leydig dan setelah dikultur menghasilkan konsentrasi dan viabilitas sel yang lebih tinggi dibandingkan dengan gradien Percoll.

Kata kunci: sel Leydig, kolom, Nycodenz, Percoll, kemurnian, viabilitas

ABSTRACT

This research aim to find out the isolation and purification of Leydig cells using a Nycodenz gradient to increase cell viability after purification and cultured. Isolation and purification of Leydig cells were carried out using Nycodenz gradient with 3 columns (5, 10, 15% as Nycodenz I), and 5 column (4, 8, 10, 12, 15% as Nycodenz II) and Percoll gradient as control. The concentration, purity and viability of Leydig cells were evaluated after isolation and purification and *in vitro* cultured. The results showed that the isolation and purification of Leydig cells using Nycodenz gradient (I and II) yielded significantly ($P < 0,01$) in lower concentrations compared to a Percoll gradient. Isolation and purification of Leydig cells using Nycodenz gradient II tends to produce higher purity (91.40%) compared to Nycodenz I (85.53%). However, this results were not significantly different compared to the Percoll gradient (92.22%). Leydig cells viability were 98% similar in all treatments. However, after 3 days cultured Leydig cells yielded significantly ($P < 0,05$) in lower concentration in Percoll (2.44×10^6 sel/ml) and Nycodenz I (3.21×10^6 sel/ml) compared to Nycodenz II (3.88×10^6 sel/ml), and Leydig cells viability were significantly ($P < 0,01$) higher at Nycodenz I (90.00%) and Nycodenz II (91.70%) than Percoll (82.30%). Based on these results it can be concluded that Nycodenz II gradient is effective to purify Leydig cells, and after cultured for 3 days, the Leydig cell concentration and viability were significantly higher in Nycodenz II than Percoll gradient.

Key words: Leydig cells, column, Nycodenz, Percoll, purity, viability

PENDAHULUAN

Hormon testosteron dihasilkan oleh sel Leydig dan berperan penting dalam proses spermatogenesis yaitu perkembangan sel spermatogonia menjadi spermatozoa. Kekurangan hormon testosteron dapat menghambat proses spermatogenesis dalam tubulus seminiferus. Pada saat ini, penyakit kelainan atau kegagalan reproduksi pada jantan seperti defisiensi testosteron umumnya diatasi dengan cara pemberian suplemen hormon testosteron sintetis. Pada manusia, terapi dengan cara ini dapat menyebabkan risiko jangka panjang seperti penyakit jantung koroner, retensi cairan, kanker prostat, dan sebagainya (Gruenewald dan Matsumoto 2003). Beberapa peneliti telah melakukan upaya terapi alternatif dengan menggunakan transplantasi sel Leydig sebagai penghasil hormon testosteron. Penggunaan sel

Leydig sebagai terapi alternatif penghasil hormon testosteron membutuhkan sumber sel Leydig dalam konsentrasi dan viabilitas yang memadai. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk menghasilkan sel Leydig dengan konsentrasi, kemurnian, dan viabilitas tinggi, baik setelah purifikasi maupun setelah dikultur secara *in vitro*.

Isolasi dan purifikasi sel Leydig telah banyak dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya gradien Percoll dengan konsentrasi yang bervariasi. Percoll adalah silika koloid yang dilapisi oleh *polyvinylpyrrolidone* (PVP) merupakan bahan yang dapat digunakan untuk memisahkan berbagai jenis sel. Hasil purifikasi Chemes *et al.* (1992) menggunakan gradien Percoll diskontinu pada gradien 34 dan 60% menghasilkan sel Leydig dengan kemurnian 90%, sedangkan Bilinska *et al.* (2009) menggunakan metode

yang sama memperoleh kemurnian sebesar 80-83% hasil peneguhan dengan pewarnaan 3β -hydroxysteroid dehidrogenase (3β -HSD).

Wakefield *et al.* (1982) melaporkan bahwa penggunaan gradien Percoll untuk mengisolasi sel Leydig tikus pada suhu 20-37° C dapat menyebabkan partikel Percoll masuk ke dalam sel Leydig yang berakibat menurunnya viabilitas sel karena Percoll bersifat sitotoksik. Gradien pemisah sel lainnya adalah Nycodenz atau Iohexol, yang mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan Percoll diantaranya mempunyai osmolalitas dan viskositas rendah tetapi densitas yang tinggi, sehingga dapat secara efektif memisahkan makromolekul dan sel dengan rentang ukuran yang lebih luas untuk jenis sel yang lebih bervariasi. Nycodenz bersifat stabil, larut dalam air dan dapat disterilisasi dengan filter *syringe* sehingga mudah digunakan di laboratorium, bersifat non sitotoksik terhadap sel mammalia. Selain itu, Nycodenz dengan mudah dapat dihilangkan dari suspensi sel dengan cara sentrifugasi dibandingkan dengan gradien dari bahan lain karena residu gradien pemisah dapat menyebabkan kematian sel. Nycodenz dapat digunakan secara mudah dengan metode sederhana tanpa ada keterbatasan dalam suhu, pH, dan stabilitas (Miller, 2006). Gradien Nycodenz telah digunakan untuk memisahkan sel darah, sel hati, *primordial germ cell* (PGC), spermatogonia dan sel Sertoli (Evans dan Flint 1985; Nakayama *et al.*, 1999; Manayagi *et al.*, 2003), namun penelitian menggunakan gradien Nycodenz untuk mengisolasi sel Leydig pada tikus belum dilaporkan. Untuk itu, penelitian ini dilakukan untuk menguji efektivitas gradien Nycodenz dalam meningkatkan konsentrasi, kemurnian, dan viabilitas sel Leydig setelah diisolasi dan purifikasi serta kultur *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Pembuatan Suspensi Sel Testikuler

Tikus (*Sprague Dawley*) jantan dewasa berumur 8-10 minggu diambil testisnya setelah dibius dengan ether dan dikorbankan dengan cara *cervical dislocation*. Selaput tunika albuginea dan jaringan ikat lainnya dibuang, kemudian jaringan testis ditempatkan di dalam cawan petri berisi medium *Dulbecco's phosphate buffer saline* (DPBS) tanpa Ca dan Mg. Jaringan tersebut kemudian dicuci sebanyak 3 kali menggunakan medium DPBS yang ditambah serum (*newborn calf serum*, NBCS) 0,1%. Pengambilan jaringan testis dilakukan secara aseptis kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml *collagenase* 0,04% dan *trypsin inhibitor* 10 μ g/ml dalam DPBS dan diinkubasi di dalam *waterbath* pada suhu 34° C selama 40 menit. Suspensi sel diencerkan sebanyak 4 kali volume awal dengan medium DPBS serum, kemudian didiamkan selama 2 menit agar sel mengendap. Cairan supernatan dikoleksi dan disentrifugasi dengan kecepatan 200 g selama 3 menit. Pelet sel dicuci sebanyak 2 kali menggunakan medium DPBS serum dengan cara yang sama. Terakhir, pelet sel diencerkan dengan 500 μ l medium DPBS serum.

Isolasi dan Purifikasi

Isolasi dan purifikasi sel Leydig dilakukan dengan menggunakan metode gradien Nycodenz yang dimodifikasi dari Nakayama *et al.* (1999). Pelet sel yang telah diencerkan kemudian dimasukkan ke dalam larutan Nycodenz dengan gradien 5, 10, dan 15% (Nycodenz I) atau gradien 4, 8, 10, 12, dan 15% (Nycodenz II). Setelah itu, larutan gradien disentrifugasi menggunakan sentrifus *swing rotor* dengan kecepatan 1.500 g selama 10 menit pada suhu ruang. Lapisan (fraksi) sel yang terbentuk kemudian dikoleksi dan dicuci berturut-turut dengan DPBS serum sebanyak 4 kali dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 200 g selama 3 menit. Pelet sel diencerkan dengan 500 μ l medium DPBS serum. Sebagai kontrol, isolasi dan purifikasi sel Leydig dilakukan dengan menggunakan gradien Percoll 21, 26, 34, 40, dan 60% (modifikasi Chemes *et al.*, 1992). Setelah itu suspensi sel disentrifugasi berturut-turut dengan kecepatan 400 g selama 15 menit dan 800 g selama 15 menit dengan menggunakan sentrifus *swing rotor* pada suhu ruang, kemudian dilakukan perlakuan seperti pada Nycodenz.

Kultur *in Vitro*

Sebanyak 1×10^6 sel/ml suspensi sel Leydig dari masing-masing perlakuan dikoleksi dan dikultur dalam medium DMEM yang ditambah NBCS 10% dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37° C selama 3 hari.

Evaluasi dan Analisis Data

Evaluasi dilakukan pada saat setelah purifikasi melalui penghitungan konsentrasi sel dengan menggunakan hemositometer (kamar hitung) *Neubauer*. Penentuan kemurnian sel Leydig dilakukan dengan pewarnaan 3β -HSD. Pewarnaan ini merupakan pewarnaan spesifik terhadap sel Leydig. Proses pewarnaan dapat mendeteksi enzim 3β -HSD yang terdapat di dalam sel Leydig dan menyebabkan sel berwarna ungu. Viabilitas sel dapat diuji dengan menggunakan pewarna *trypan blue*. Sel yang mati akan berwarna biru karena mengalami kerusakan membran sehingga zat pewarna dapat masuk ke dalam sel. Evaluasi terhadap konsentrasi dan viabilitas sel dilakukan setelah kultur *in vitro*. Setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Data yang diperoleh kemudian diuji secara statistik dengan uji Anova dengan tingkat kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Suspensi Testiskuler Hasil Disosiasi

Sel Leydig merupakan sel yang berada di jaringan interstisial diantara tubuli seminiferi testis. Isolasi sel Leydig dilakukan dengan cara disosiasi jaringan testis menggunakan enzim *collagenase* dan *trypsin inhibitor*, sehingga diperoleh suspensi sel testiskuler yang terdiri atas sel-sel gamet yakni spermatogonia, spermatosit, spermatid, spermatozoa, serta sel-sel somatis lainnya seperti sel Sertoli, sel Leydig, fibroblast, dan sel darah seperti yang disajikan pada Gambar 1.

Hasil isolasi dari jaringan tubuli seminiferi tersebut belum dapat digunakan untuk mendapatkan sel Leydig secara homogen, karena proses isolasi tidak secara selektif memisahkan sel Leydig dari sel-sel testiskuler lainnya. Sel-sel yang diisolasi dapat dibedakan berdasarkan morfologi dan ukuran sel. Spermatid berukuran 10 µm dan spermatozoa mempunyai panjang sekitar 60 µm. Sel Sertoli berbentuk ovoid, berukuran besar, dan mempunyai inti yang besar (Anonimus, 2012). Sel Leydig dewasa pada kondisi *in vivo* berbentuk poligonal. Sel Leydig manusia mempunyai ukuran sel 12,0-17,4 µm (Heller dan Leach 1971) dan 15-20 µm pada kelinci (Anonimus, 2012). Di dalam jaringan interstitial terdapat dua populasi sel Leydig yaitu sel tunggal dan kelompok sel (*cluster*) (Salva *et al.*, 2001). Untuk memperoleh sel Leydig yang homogen diperlukan proses purifikasi dan hasilnya kemudian diteguhkan dengan pewarnaan 3β-HSD.

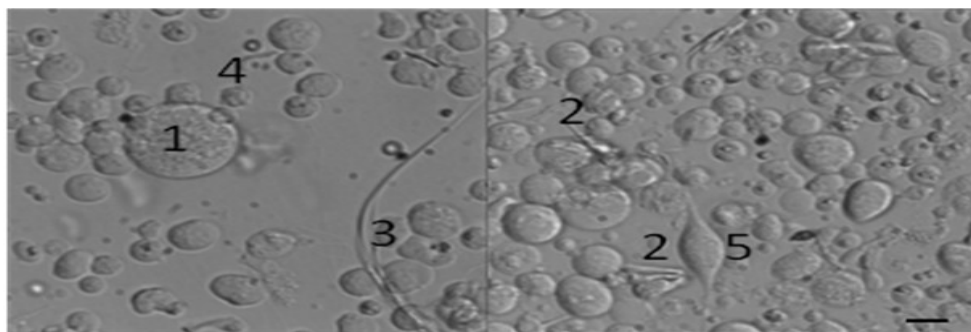
Konsentrasi, Kemurnian dan Viabilitas Sel Leydig Setelah Isolasi dan Purifikasi

Purifikasi sel Leydig dengan gradien Nycodenz I (3 kolom) dan Nycodenz II (5 kolom) diperoleh lapisan sel Leydig masing-masing diantara gradien 5 dan 10% dan gradien 8 dan 10%, sedangkan dengan menggunakan gradien Percoll (5 kolom) diperoleh lapisan sel Leydig di antara gradien 34 dan 40%. Hasil purifikasi dengan Percoll pada penelitian ini sejalan dengan penelitian Prasetyaningtyas *et al.* (2011) yang memperoleh lapisan sel Leydig di antara gradien yang sama.

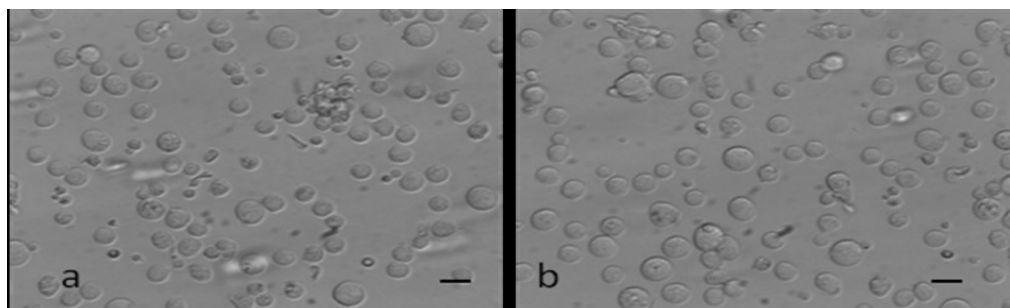
Purifikasi sel Leydig menggunakan gradien Nycodenz ataupun Percoll merupakan metode purifikasi berdasarkan densitas. Gradien Nycodenz dan Percoll telah digunakan untuk memisahkan beberapa

jenis sel dari suspensi sel hasil isolasi. Gradien untuk purifikasi sel harus memiliki beberapa syarat seperti mempunyai gradien densitas yang sesuai dengan sel yang akan dipurifikasi, bersifat iso-osmotik, mempunyai viskositas rendah, tidak toksik dan tidak memasuki membran sel serta dapat dengan mudah dihilangkan dari medium. Setelah sentrifugasi akan terbentuk lapisan sel berwarna putih susu pada gradien. Jika densitas awal setara dengan dengan densitas sel, lapisan akan tampak besar dan berada pada bagian tengah gradien, sedangkan pada densitas sel lebih tinggi atau lebih rendah daripada densitas awal maka akan terbentuk lapisan tipis pada gradien yang berbeda. Lapisan sel akan mengambil posisi gradien pada Percoll atau Nycodenz yang sesuai dengan densitas gradien (Sharpe 1988; Amersham Biosciences, 2010). Perbedaan densitas antara gradien Nycodenz dengan Percoll adalah Nycodenz mempunyai densitas 1,426 g/ml (80% v/w), sedangkan Percoll 1,130 g/ml (23% w/w) dalam bentuk larutan koloid. Hal lain yang dapat mempengaruhi posisi terbentuknya lapisan sel pada gradien adalah viskositas, osmolalitas, dan konsentrasi gradien yang digunakan. Oleh karena itu, pada penelitian ini terdapat perbedaan posisi pembentukan lapisan sel pada gradien Nycodenz dengan gradien Percoll.

Setelah dipurifikasi menggunakan gradien Nycodenz atau Percoll, tampak populasi sel Leydig menjadi lebih homogen dibandingkan sebelumnya seperti yang disajikan pada Gambar 2. Hal tersebut ditunjukkan oleh persentase kemurnian sel Leydig yang diperoleh yaitu di antara 85-92% (Tabel 1) dan dibuktikan dengan pewarnaan 3β-HSD yang menghasilkan sel yang positif terhadap pewarnaan tersebut menandakan bahwa sel-sel



Gambar 1. Populasi suspensi sel testiskuler hasil disosiasi jaringan testis tikus dengan enzim *collagenase* dan *trypsin inhibitor* (1 = spermatogonia, 2 = spermatid, 3 = spermatozoa, 4 = sel darah merah, dan 5 = fibroblas. Skala = 10 µm)



Gambar 2. Hasil purifikasi sel Leydig dengan menggunakan (a) gradien Nycodenz dan (b) gradien Percoll (Skala = 10 µm)

tersebut adalah sel Leydig (Gambar 3a). Pada populasi sel tersebut masih ditemukan adanya spermatid dan sel darah merah dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan populasi sel sebelum dipurifikasi. Sel Leydig pada hasil purifikasi dengan gradien Nycodenz (Gambar 2a) lebih banyak mempunyai sel dengan ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan sel hasil purifikasi dengan gradien Percoll (2b). Ukuran sel Leydig bervariasi berdasarkan penambahan lipid pada sitoplasma. Perubahan sel Leydig dewasa *immature* menjadi sel Leydig *mature* dikenali dengan adanya peningkatan ukuran sel dan hilangnya droplet lipid pada sitoplasma (Mendis-Handagama dan Ariyaratne, 2001). Hal yang sama terlihat pada Gambar 3a.

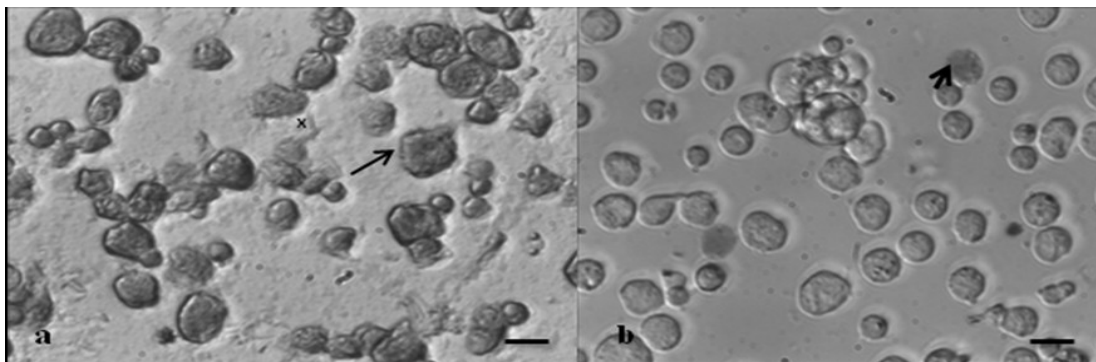
Pengujian viabilitas sel Leydig hasil purifikasi digunakan untuk mengetahui kualitas sel setelah dipurifikasi oleh gradien Nycodenz maupun Percoll. Pada Gambar 3b tampak viabilitas sel Leydig tinggi yang ditunjukkan dengan sedikitnya jumlah sel Leydig berwarna biru (sel mati). Viabilitas sel Leydig dari hasil koleksi dengan tiga metode tersebut menghasilkan viabilitas pada Nycodenz I (98,93%) dan Nycodenz II (98,17%) serta Percoll (98,00 %) (Tabel 1). Hasil isolasi dan purifikasi menggunakan gradien Nycodenz maupun gradien Percoll tidak memengaruhi viabilitas sel Leydig.

Konsentrasi sel Leydig hasil isolasi dan purifikasi dengan gradien Nycodenz secara sangat nyata ($P < 0,01$) lebih rendah ($7,03 - 7,12 \times 10^6$ sel/ml) dibandingkan dengan menggunakan gradien Percoll ($15,42 \times 10^6$ sel/ml) (Tabel 1). Kecepatan dan waktu sentrifugasi serta konsentrasi gradien dapat mempengaruhi jumlah sel yang dipurifikasi (Thermo, 2012). Sel Leydig yang diperoleh pada gradien Nycodenz lebih sedikit daripada gradien Percoll, kemungkinan disebabkan belum optimal kecepatan dan waktu serta gradien konsentrasi

yang digunakan untuk purifikasi sel Leydig menggunakan gradien Nycodenz. Waktu dan kecepatan sentrifugasi yang tepat diperlukan supaya sel Leydig berada dalam gradien yang seharusnya karena jika terlalu lama dan/atau terlalu cepat maka semua sel akan mengendap di dasar tabung.

Purifikasi yang dilakukan menggunakan gradien Nycodenz 3 kolom berdasarkan (Nakayama *et al.* 1999) diperoleh kemurnian sel Leydig yang relatif rendah yaitu 85,53%. Untuk meningkatkan kemurnian sel Leydig, dilakukan modifikasi penggunaan gradien Nycodenz menjadi 5 kolom dan diperoleh peningkatan kemurnian sel Leydig menjadi 91,40%. Kemurnian sel Leydig tersebut tidak berbeda dengan hasil purifikasi dengan gradien Percoll (92,22%). Hasil tersebut berpengaruh terhadap perolehan jumlah sel Leydig hidup setelah isolasi dan purifikasi, sehingga jumlah sel Leydig hidup pada gradien Percoll secara nyata ($p < 0,05$) lebih tinggi ($13,94 \times 10^6$ sel/ml) dibandingkan dengan gradien Nycodenz I ($6,02 \times 10^6$ sel/ml) dan Nycodenz II ($6,30 \times 10^6$ sel/ml). Perbedaan rentang kolom gradien dapat mempengaruhi proses pemisahan sel, semakin banyak jumlah kolom yang digunakan akan meningkatkan seleksi sel. Pada Nycodenz I yang terdiri dari 3 kolom, sel Leydig diperoleh berada di antara gradien 5 dan 10%, sedangkan pada Nycodenz II (5 kolom) sel Leydig diperoleh di antara 8 dan 10%. Hal ini menunjukkan bahwa pada gradien Nycodenz dengan rentang konsentrasi gradien yang lebih pendek dapat mempurifikasi sel Leydig dan menghasilkan kemurnian yang lebih tinggi.

Purifikasi sel Leydig menggunakan Nycodenz belum dilakukan oleh peneliti lain. Peningkatan persentase kemurnian sel Leydig pada gradien Nycodenz II belum diikuti oleh peningkatan konsentrasi sel Leydig dibandingkan dengan konsentrasi sel pada purifikasi



Gambar 3. Sel Leydig setelah pewarnaan dengan (a) 3β-HSD (b) *Trypan Blue* (a = Sel Leydig adalah sel yang berwarna ungu, menunjukkan sel positif 3β-HSD (tanda panah); sel tidak berwarna (x) adalah sel non Leydig, b = Warna biru menunjukkan sel Leydig yang mati (kepala panah). Skala = 20 μm).

Tabel 1. Konsentrasi, kemurnian, dan viabilitas sel Leydig hasil purifikasi dengan gradien Nycodenz dan Percoll

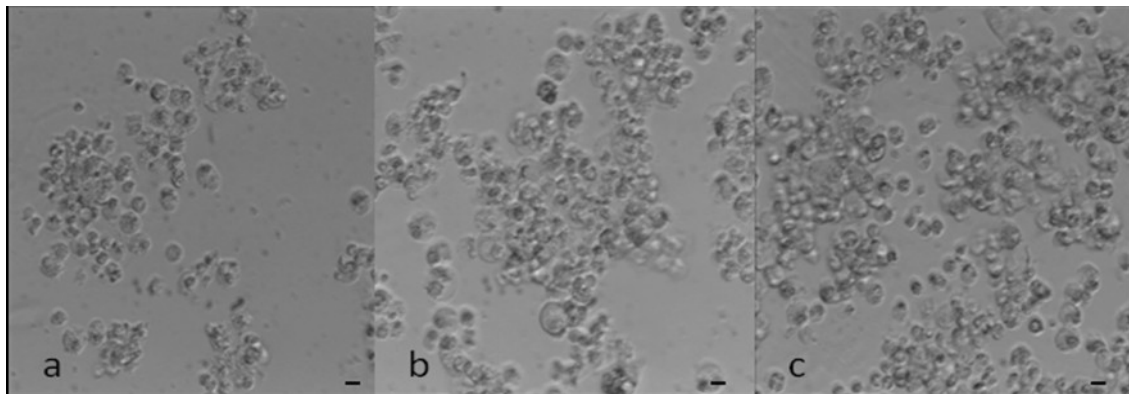
Perlakuan Pemurnian	Sel Leydig			
	Konsentrasi (10^6 /ml)	Kemurnian (%)	Viabilitas (%)	Jumlah hidup (10^6 /ml)
Percoll	15,42±1,18 ^a	92,22±2,34	98,00±1,56	13,94 ^a
Nycodenz I	7,12±1,25 ^b	85,53±7,03	98,93±0,78	6,02 ^b
Nycodenz II	7,03±1,04 ^b	91,40±5,02	98,17±0,51	6,30 ^b

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Tabel 2. Konsentrasi dan viabilitas sel Leydig hasil purifikasi dan dikultur *in vitro* selama 3 hari

Perlakuan Pemurnian	Konsentrasi awal (10 ⁶ sel/ml)	Sel Leydig setelah kultur		
		Konsentrasi (10 ⁶ sel/ml)	Viabilitas (%)	Jumlah hidup (10 ⁶ sel/ml)
Percoll	1	2,44±0,61 ^a	82,30±2,71 ^a	2,00 ^a
Nycodenz I	1	3,21±0,45 ^b	90,00±1,41 ^b	2,89 ^b
Nycodenz II	1	3,88±0,32 ^c	91,16±1,19 ^b	3,53 ^b

^{a,b,c} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)



Gambar 4. Sel Leydig hasil purifikasi dengan beberapa gradien perlakuan setelah dikultur selama 3 hari (a = Percoll; b = Nycodenz I; c = Nycodenz II. Skala = 10 µm)

dengan Percoll. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengembangkan metode purifikasi sel Leydig dengan beberapa kombinasi konsentrasi gradien Nycodenz lain serta optimasi kecepatan dan waktu sentrifugasi sehingga akan mempurifikasi sel Leydig dengan lebih baik.

Konsentrasi dan Viabilitas Sel Leydig Setelah Purifikasi dan Kultur *In Vitro*

Kualitas sel Leydig setelah dikultur selama 3 hari disajikan pada Tabel 2. Viabilitas sel Leydig setelah dikultur menurun pada semua perlakuan dibandingkan setelah purifikasi. Setelah kultur, viabilitas sel pada perlakuan dengan gradien Percoll menurun secara nyata (82,30%) (P<0,05) dibandingkan dengan penggunaan gradien Nycodenz I (90,00%) dan gradien Nycodenz II (91,16%). Hal ini membuktikan bahwa Nycodenz tidak bersifat sitotoksik terhadap sel Leydig (Miller, 2006), sehingga lebih banyak sel yang hidup setelah dikultur. Penggunaan Percoll untuk isolasi dan purifikasi diperoleh jumlah dan kemurnian sel Leydig yang lebih tinggi, tetapi Percoll bersifat toksik rendah dan dapat dimetabolisme oleh sel Leydig (Wakefield *et al.*, 1982). Hal tersebut diduga menyebabkan penurunan viabilitas sel Leydig setelah dikultur.

Berdasarkan Gambar 4 dapat dilihat bahwa perbedaan gradien purifikasi mempengaruhi konsentrasi sel yang hidup setelah dikultur selama 3 hari. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi sel pada kultur sel Leydig yang berasal dari purifikasi Percoll (Gambar 4a) lebih sedikit jika dibandingkan dengan Nycodenz (Gambar 4b dan c). Hasil tersebut didukung oleh jumlah sel Leydig yang hidup setelah dikultur yang meningkat secara nyata (p<0,05) pada gradien Nycodenz (2,89x10⁶

sel/ml dan 3,53x10⁶ sel/ml) dibandingkan dengan Percoll (2,00x10⁶ sel/ml). Hal tersebut kemungkinan disebabkan lebih banyak sel yang mati sebagai akibat sifat toksik rendah pada penggunaan gradien Percoll. Oleh karena itu, penggunaan gradien Nycodenz yang bersifat non sitotoksik untuk isolasi dan purifikasi sel Leydig menjadi lebih baik.

KESIMPULAN

Penggunaan gradien Nycodenz II efektif mempurifikasi sel Leydig dengan kemurnian yang sama dengan gradien Percoll, namun konsentrasi sel Leydig setelah purifikasi dengan gradien Nycodenz II lebih rendah dibandingkan dengan gradien Percoll. Setelah dikultur selama 3 hari, konsentrasi dan viabilitas sel Leydig hasil purifikasi dengan gradien Nycodenz II lebih tinggi dibandingkan dengan gradien Percoll.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2012. Blue Histology: Male Reproductive System. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/malerepro/malerepro.htm#Testes>
- Amersham Bioscience. 2010. Percoll : Methodology and Applications.
- Bilinska B., M. Kotula-Balak, and J. Sadowska. 2009. Morphology and function of human Leydig cells in vitro. Immunocytochemical and radioimmunological. *European J. Histochem.* 53:35-42.
- Chemes, H., S. Cigorraga, C. Bergada, H. Scheingart, R. Rey, and E. Pellizzari. 1992. Isolation of human Leydig cell mesenchymal precursors from patients with the androgen sensitivity syndrome: Testosterone production and response to human chorionic gonadotrophin stimulation in culture. *Biol. Reprod.* 46:793-801.
- Evans, W.H. and N. Flint. 1985. Subfractionation of hepatic endosomes in Nycodenz gradients and by free electrophoresis. *Biochem. J.* 232:25-32 (Abstract).

- Gruenewald D.A. and A.M. Matsumoto. 2003. Testosterone supplementation therapy for older men: Potential benefits and risks. **J. American Geriatrics Society** 51(1):101-115
- Heller C.G. and D.R. Leach. 1971. Quantification of Leydig cells and measurement of Leydig-cell size following administration of human Chorionic Gonadotrophin to normal men. **J. Reprod. Fert.** 25:185-192.
- Manayagi, T., R. Kurosawa, K. Ohnuma, A. Ueyama, K. Ito, and J. Takahashi. 2003. Purification of mouse primordial germ cells by Nycodenz. **Reproduction** 125:667-675.
- Mendis-Handagama S.M.L.C. and H.B.S. Ariyaratne. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. **Biol. Reprod.** 65:660-671.
- Miller S.R. 2006. Assessment of Nycodenz Gradient on Enrichment and Culture of Perinatal Porcine Spermatogonial Stem Cell. **Thesis**. The Graduate Faculty of North Carolina State University. USA.
- Nakayama Y., T. Yamamoto, and S. Abe. 1999. IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. **Int. J. Dev. Biol.** 43:343-347.
- Prasetyaningtyas W.E., K. Mohamad, dan I. Batubara. 2011. Pemanfaatan enkapsulasi sel-sel Leydig untuk terapi defisiensi hormon testosteron. **Laporan**. Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Salva A., G.R. Klinefelter, and M.P. Hardy. 2001. Purification of rat Leydig cells: Increased yields after unit-gravity sedimentation of collagenase-dispersed interstitial cells. **J. Androl.** 22:665-671
- Sharpe P.T. 1988. **Methods of Cell Separation**. <http://books.google.co.id/>
- Thermo. 2012. **Basic centrifugation**. <http://www.coleparmer.com/TechLibraryArticle/30>
- Wakefield, J. St. J., J.S. Gale, M.V. Berridge, T.W. Jordan, and H.C. Ford. 1982. Is Percoll innocuous cells? **Biochem. J.** 202:795-797.