

BAB II

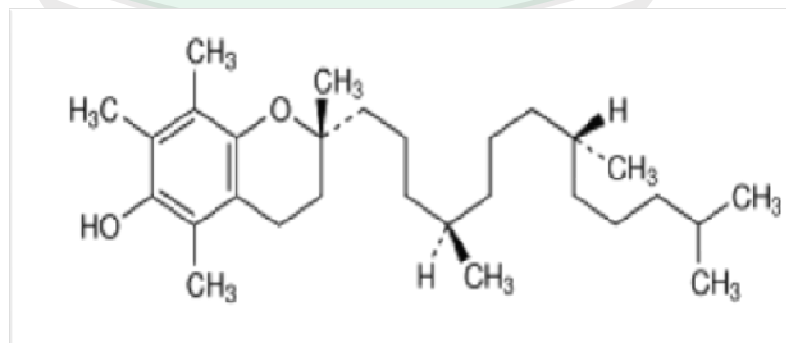
KAJIAN PUSTAKA

2.1 Vitamin E (*α -Tocoferol*)

2.1.1 Struktur Kimia Vitamin E (*α -Tocoferol*)

Vitamin E merupakan vitamin yang mempunyai 2 macam struktur yang berbeda yaitu *tocopherol* dan *tocotrienol*, dari kedua kelompok tersebut terdapat 8 buah ikatan yaitu 4 *tocopherol* dan 4 *tocotrienol*. Diantara delapan macam substansi tersebut substansi *α tocoferol* adalah jenis yang mempunyai aktivitas biologi yang tertinggi dan terdapat dalam jumlah besar dalam jaringan tubuh (Goodman dan Gillman's, 1991).

Struktur kimia vitamin E terdiri dari rantai kroman dan phitil. Pada rantai kroman terdapat cincin fenol dan heterosiklik. Cincin fenol pada rantai kroman memiliki gugus OH yang menyumbangkan atom H untuk radikal bebas (Hariyatmi 2004), sehingga menstabilkan elektron yang tidak berpasangan. Hal tersebut melibatkan donasi hidrogen *fenol* ke radikal bebas dari asam lemak (atau $O^{\cdot -}$) untuk melindungi serangan senyawa tersebut pada PUFAs yang lain (Cuppini, 2001).



Gambar 2.1. Struktur Kimia Vitamin E (*α -Tocoferol*) (Cuppini, 2001).

2.1.2 Vitamin E (*α-Tocoferol*) sebagai Antioksidan

Vitamin E merupakan salah satu vitamin yang aktivitas antioksidannya tinggi dibanding dengan antioksidan lain. Vitamin E berfungsi sebagai pemelihara keseimbangan intraselluler dan sebagai antioksidan (Alava *et al.*, 1993). Sebagai antioksidan, vitamin E berfungsi sebagai donor ion hidrogen untuk radikal bebas. Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan (Winarsih, 2007).

Radikal bebas mempunyai sifat reaktifitas tinggi, karena mampu menarik elektron disekitarnya, serta dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal. Kemampuan radikal bebas dalam menarik elektron, sama halnya dengan oksidan. Maka dari itu radikal bebas dapat digolongkan sebagai oksidan, tetapi tidak semua oksidan dapat digolongkan sebagai radikal bebas. Radikal bebas akan membentuk radikal baru apabila bertemu molekul lain, sehingga terjadi reaksi berantai (*chain reaction*) yang bersifat merusak sel. Daya rusak radikal bebas jauh lebih besar, dibanding dengan oksigen biasa. Reaksi rantai tersebut akan berhenti apabila di dalam sel terdapat antioksidan (Sareharto, 2010).

Radikal bebas yang dihasilkan dalam kondisi *in vitro* lebih banyak daripada dalam kondisi *in vivo*. Hal tersebut disebabkan karena adanya berbagai perlakuan dalam system kultur, misalnya: *washing*, sentrifus, dan tripsinasi. Perlakuan-perlakuan tersebut dapat memicu produksi radikal bebas yang berlebih dalam sel. Pada proses metabolisme sel normal, sel juga menghasilkan partikel-partikel kecil yang disebut sebagai radikal bebas. partikel-partikel tersebut dapat

merusak sel normal apabila jumlahnya terlalu banyak. Sumber utama radikal bebas adalah adanya elektron yang tidak berpasangan pada rantai transport elektron, misalnya elektron yang berada pada mitokondria, retikulum endoplasma, dan molekul oksigen penghasil superoksida (Alava *et al.*, 1993).

Vitamin E adalah antioksidan *lipid soluble* yang utama di dalam sel-sel hewan (Hossein *et al.*, 2007). Vitamin E melindungi sel dari radikal-radikal oksigen baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Chow, 1991). Vitamin E diketahui bertindak sebagai antioksidan di dalam sel dan mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada membran plasma sehingga kebutuhan membran dapat terjaga. Reaksi antioksidan dari vitamin E dapat mencegah kerusakan jaringan peroksidatif akibat radikal bebas dan vitamin E dipercaya sebagai *scavenger* radikal bebas yang utama di dalam membran sel mamalia (Jeong *et al.*, 2006). Vitamin E secara langsung menetralkan H_2O_2 (*hydrogen peroxide*), O_2^- (*superoxide anion*), dan OH^\cdot (*hydroxyl radical*) (Agarwal *et al.*, 2004).

Mekanisme *α-tocopherol* sebagai zat antioksidan belum diketahui dengan jelas, akan tetapi menurut Seidel dan Olson (2000) bahwa fungsi biologi utama dari vitamin E adalah melindungi PUFA's (*Polyunsaturated Fatty Acids*) pada membran, dimana peroksidasi lipid bisa menyebabkan kerusakan pada struktur membran, mempengaruhi fungsi dan permeabilitasnya, sehingga dengan cepat menyebabkan kerusakan dan kematian sel. Lipid mengandung PUFA's berlimpah yang merupakan target utama ROS karena lipid mempunyai ikatan rangkap dua atom karbon. Peroksidasi lipid pada membrane menyebabkan kerusakan aktifitas enzim pada membrane dan juga ion *channels*, akibatnya mekanisme sel secara

normal yang dibutuhkan untuk proses proliferasi terhambat (Agarwal *et al.*, 2004).

2.1.3 Pengaruh Pemberian Vitamin E (α -Tocopherol) dalam Media Kultur

Vitamin E merupakan media tambahan tanpa serum yang digunakan dalam biomanufacturing, kultur jaringan dan juga digunakan sebagai media khusus. Vitamin E diproduksi pada membran sel, berperan sebagai antioksidan peroksida lipid yang efektif dan larut dalam lipid (Miller, 1993).. Vitamin E akan menunjukkan hasil yang maksimal apabila digunakan secara langsung tanpa adanya proses penyimpanan terlebih dahulu, karena ketidakstabilan struktur kimia dan kelarutan tokoferol dalam air yang rendah sehingga mengakibatkan hilangnya kadar vitamin dalam media apabila disimpan terlalu lama (Chow, 1991).

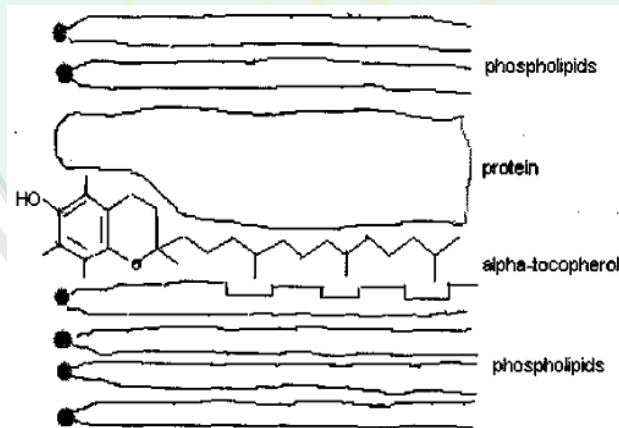
Pemberian vitamin E dalam media kultur merupakan salah satu perlakuan yang dilakukan sebagai upaya untuk meningkatkan proliferasi sel kultur paru-paru fetus hamster. Menurut Steele (1990) pemberian vitamin E dalam media kultur dapat meningkatkan proses penempelan eksplan mencit secara *in vitro*, hal tersebut dibuktikan dengan pewarnaan bahwa terlihat adanya peningkatan viabilitas embrio mencit yang dipapar panas (Arechiga, 1994).

2.1.4 Mekanisme Vitamin E (α -Tocopherol) dalam Sel Paru-Paru *In Vitro*

Vitamin E merupakan vitamin yang larut lemak dalam sel (Seidel and Olson, 2000). Berada pada bagian lemak dalam membran sel, melindungi PUFA's dalam membran dari degradasi oksidatif (Chow, 1979). Vitamin E mempunyai

kemampuan untuk mengurangi adanya suatu senyawa yang tidak seimbang dalam sel menjadi metabolit yang seimbang dengan memberikan gugus hidrogennya. Vitamin E dikenal sebagai komponen penting dari sistem pertahanan antioksidan seluler, yang melibatkan enzim-enzim yang lain seperti SODs (*superoksida dismutase*), GPXs (*glutation peroksidase*), GR (*glutation reduktase*), katalase, TR (*tioredoksin reduktase*), dan faktor-faktor non enzim (misalnya glutation, asam urat), yang mana banyak tergantung pada zat gizi esensial yang lain (Miller, 1993).

Pada membran sel vitamin E menangkap radikal bebas sehingga melindungi PUFA's, protein dari kerusakan oksidatif (Linder, 1992). Vitamin E berperan dalam menangkap radikal peroksil yang berfungsi untuk menjaga integritas dari rantai panjang asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel sehingga dapat mempertahankan bioaktivitas sel (Singha, 2008).

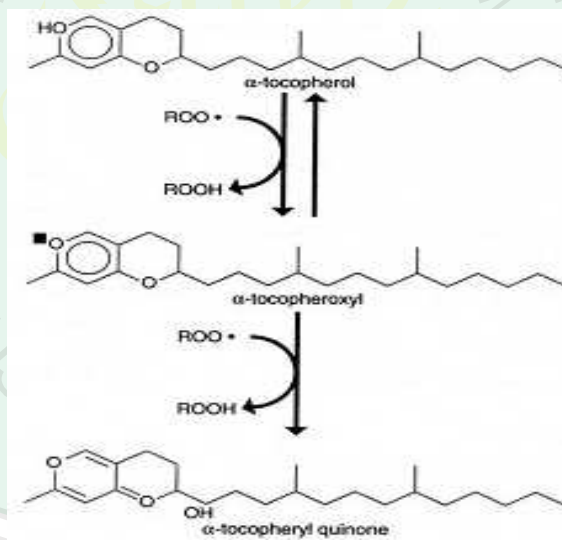


Gambar 2.2 Letak Vitamin E (α -Tocoferol) dalam Struktur Membran (Pekiner, 2003).

Vitamin E melakukan fungsinya sebagai penyumbang OH dalam sel dengan mengoksidasi *tocoferol* menjadi *tocopherylquinone*, prosesnya melalui

jalur radikal *tocopheroxyl* semistabil. Oksidasi *toferol* menjadi radikal *tocopheroxyl* adalah reaksi bolak balik, tetapi proses oksidasi selanjutnya hanya satu arah. *Tocopherylquinone* tidak mempunyai aktivitas vitamin E, α -*tocopherylquinone* dapat tereduksi menjadi α -*tocopherylhydroquinone* (Pekiner, 2003).

α -*tocopherylhydroquinone* dapat menjadi *toferol* kembali dengan mereduksi radikal *tocopheroxyl* oleh beberapa reduktan intraselular. Penelitian in vitro menunjukkan bahwa proses tersebut terjadi pada liposom, dalam mikrosom oleh NADPH, dan dalam mitokondria oleh NADH dan suksinat (Singha, 2008).



Gambar 2.3 Mekanisme vitamin E untuk mengurangi radikal bebas menjadi metabolit yang tidak berbahaya dengan memberikan gugus hidrogennya (Mahan *et al.*, 2004).

Mekanisme penghambatan peroksidasi lipid oleh vitamin E dimulai pada saat lipid (LH) kehilangan satu hidrogen dan menjadi produk radikal (L•), yang bereaksi dengan oksigen bebas untuk menghasilkan radikal peroksil (LOO•).

Dengan adanya reaksi radikal peroksil selanjutnya akan diikuti reaksi berantai, hal ini sering terjadi misalnya dalam selaput sel yang dapat mengganggu integritas struktural membran. Vitamin E dapat mengganggu reaksi berantai oleh interaksi dengan peroksil lipid membentuk radikal hydroperoksida (LOOH), sehingga radikal menjadi stabil (Mahan *et al.*, 2004).

Vitamin E masuk ke dalam sel dapat terjadi melalui proses mediasi reseptor LDL (*Low Density Lipoprotein*) membawa vitamin tersebut ke dalam sel atau melalui proses yang dibantu oleh lipoprotein lipase dimana vitamin E dilepaskan dari kilomikron dan VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). Pada sel, transpor intraseluler dari tokoferol membutuhkan protein pengikat tokoferol intraseluler. Vitamin E pada sebagian besar sel-sel non adipose terdapat pada membran sel dimana dapat dimobilisasi (Gallagher, 2004).

Lipoprotein merupakan alat transportasi plasma vitamin E, sehingga sel dapat berinteraksi dengan reseptor khusus. Interaksi diawali oleh LDL (*Low Density Lipoprotein*) sebagai reseptor vitamin E (Traber *et al.*, 1984). Vitamin E akan diikat oleh *lipid binding protein* pada membran sel, vitamin E ditransfer ke dalam sel melalui sitoplasma. Vitamin E yang masuk ke dalam sel akan bekerjasama dengan molekul transduktor sinyal untuk menstimulasi aktivitas molekul transduktor di sitosol, yang berupa enzim protein kinase dengan jalan mengaktifasi reseptor yang berikatan dengan ligan. Reseptor yang teraktifasi akan mengaktifkan beberapa molekul transduktor membran (Purnomo, 2009).

Enzim protein kinase yang teraktifasi akan mengaktifkan protein faktor transkripsi. Hal tersebut mengakibatkan protein faktor transkripsi akan berikatan

dengan segmen promotor (*enhancer*), yang akan memicu jalannya transkripsi, sehingga siklus sel menjadi lebih cepat dan sel akan lebih cepat konfluen (Purnomo, 2009).

2.2 DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*)

2.2.1 Komponen DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*)

DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) merupakan suatu medium dasar yang terdiri dari vitamin, asam amino, garam, glukosa dan pH indikator. Pada media DMEM tidak terdapat protein, oleh karena itu memerlukan suplementasi untuk menjadi medium yang lengkap, diantaranya dengan penambahan 5-20% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Djati, 2006).

DMEM mempunyai kadar glukosa tinggi yang disuplementasi oleh deksametason, sodium pirofosfat, prolin, TGF (*Tumor Growth Factor*), insulin, transferin, asam seleneic, BSA (*Bovine Serum Albumin*), dan asam linoleat. Komponen Media dapat mempengaruhi aktivitas sel kultur. DMEM mengandung glukosa lebih (4500 mg / L) dari MEM (1000 mg / L) dan RPMI 1640 (2000 mg / L) (Shuler, 2002).

Komponen dalam DMEM dapat mempengaruhi aktivitas sel kultur, seperti asam amino, vitamin, garam, glukosa, dan suplemen organik. Asam amino, terdapat sepuluh jenis asam amino yang tidak dapat disintesis oleh tubuh dan sistein serta tirosin diperlukan oleh sel yang dikultur. Kadar asam amino tersebut dapat berpengaruh pada kelangsungan hidup dan kecepatan tumbuh sel (Trenggono, 2009).

Pada kultur kelengkapan vitamin sangat dibutuhkan dan sangat esensial, terutama dari kelompok vitamin B, walaupun di dalam medium telah terdapat protein, tetapi vitamin sangat mempengaruhi kelangsungan hidup dan kecepatan tumbuh sel kultur. Pada medium bebas serum, sering ditambahkan vitamin yang larut di dalam lemak (Shuler, 2002).

Garam merupakan komponen utama dalam menentukan osmolitas, misalnya Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} dan HCO_3^- . Glukosa dalam medium digunakan sebagai sumber energi. Glukosa mengalami glikolisis untuk membentuk piruvat yang kemudian diubah menjadi laktat atau asetoasetat, kemudian masuk ke dalam siklus asam sitrat untuk membentuk CO_2 (Trenggono, 2009). Suplemen Organik, media yang kompleks memiliki berbagai senyawa seperti nukleosida-nukleosida, yang merupakan produk antara siklus asam sitrat piruvat, dan lipid (Shuler, 2002).

2.2.2 Peran Media DMEM dalam Kultur Sel

Peran media DMEM adalah sebagai sumber nutrisi dan respirasi serta untuk memberi dukungan pada kehidupan sel yang dibiakkan agar dapat tumbuh dan berkembang biak (Trenggono, 2009) serta untuk mempertahankan kondisi sel sesuai dengan lingkungan *in vivo* yang dibutuhkan (Djati, 2006) dan sebagai mediator pertumbuhan bagi sel yang dikultur. Teknik kultur jaringan akan berhasil bila pemilihan medium yang digunakan tepat karena dalam medium terdapat kebutuhan dari sel yang dikultur. Medium yang digunakan didasarkan pada sel yang akan digunakan dalam kultur (Wetter, 1991).

Konsentrasi glukosa, asam amino dan vitamin dalam DMEM mempengaruhi pertumbuhan sel kultur (Shuler, 2002). Sel akan berproliferasi apabila kebutuhan nutrisinya terpenuhi. Oleh karena itu pengontrolan media dalam media kultur harus selalu dilakukan sampai sel mencapai konfluen (Trenggono, 2009).

Sel memerlukan media sebagai sumber nutrisi yang berguna untuk proses proliferasi sel sampai mencapai konfluen, apabila nutrisi tersebut tidak terpenuhi, maka sel tersebut akan mengalami kerusakan dan akhirnya akan mengalami kematian. Sel merupakan susunan terkecil dari makhluk hidup, Allah menciptakan semua makhluk hidup di dunia ini membutuhkan makanan untuk kelangsungan hidupnya, begitu juga dengan sel, yang memerlukan zat makanan (nutrisi) untuk melakukan fungsinya dengan normal. sebagaimana dalam firman Allah Swt. Alquran surat al Anbiyaa': 8.

وَمَا جَعَلْنَاهُمْ جَسَدًا لَّا يَأْكُلُونَ الطَّعَامَ وَمَا كَانُوا خَالِدِينَ ﴿٨﴾

"Dan tidaklah kami jadikan mereka tubuh-tubuh yang tiada memakan makanan, dan tidak (pula) mereka itu orang-orang yang kekal." (Qs. al Anbiyaa': 8).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menjadikan semua makhluk hidup memerlukan makan dan menjadikannya tidak kekal. Sebagaimana pada sistem kultur juga memerlukan media sebagai sumber nutrisi yaitu media DMEM yang berguna untuk menyokong kehidupan dan proses proliferasi sel, sehingga sel dapat melakukan fungsinya dengan baik. Apabila kebutuhan sel tersebut kurang atau tidak terpenuhi maka sel akan mengalami kerusakan atau kematian, karena kejadian akhir dari semua ciptaan Allah adalah berupa kematian (kehancuran).

2.3 Anatomi dan Fisiologi Organ Paru-paru

Paru-paru merupakan organ yang elastis, berbentuk kerucut dengan lubang besar untuk keluar masuknya udara yang terdapat didalam rongga dada atau torak (Amindariati, 2003). Sebagai organ pertukaran O₂ dan CO₂, paru-paru mempunyai banyak jaringan penting didalamnya, baik sebagai jalan napas maupun sebagai jalan difusi gas-gas antara alveolus dengan kapiler darah (Ganong, 1980).

Paru-paru terdiri dari dua bagian yaitu kiri dan kanan, dimana setiap bagian dilapisi dengan pleura pulmonary. Paru sebelah kanan merupakan bagian yang lebih besar daripada sebelah kiri. Paru sebelah kanan terdiri atas empat lobus yaitu *cranial*, *middle (vardiac)*, *caudal* dan *accessory (intermediate)*. Sedangkan paru sebelah kiri terdiri atas dua lobus yaitu *lobus cranial* dan *caudal*. Bagian terbesar dalam paru-paru adalah bronki, pembuluh darah pulmonary, rembronkial dan periveskular. Bronki sebelah kiri dan kanan akan menyatu pada tracheal bifurcation diatas jantung dan setelah masuk ke dalam paru. percabangan bronkus akan menuju ke *lobus cranial* dan *caudal* (Dyce *et al.*, 1996).

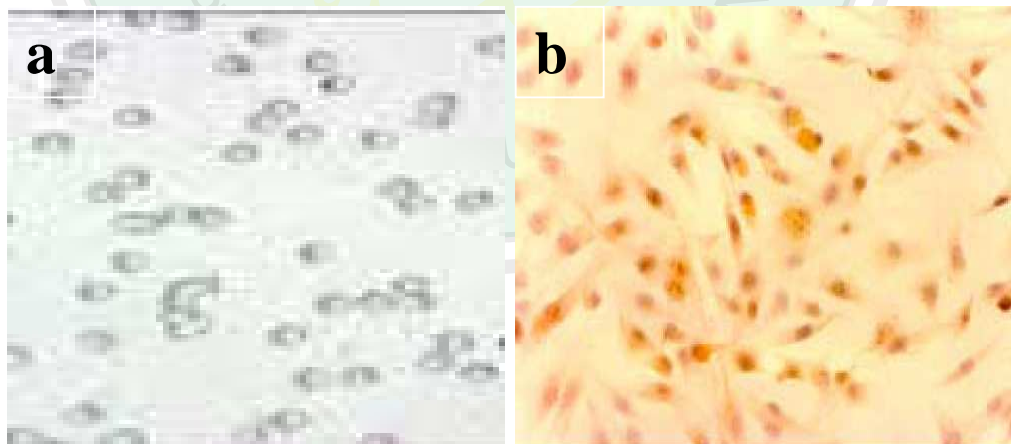
Paru-paru disusun oleh lobus pulmodekstra superior, lobus media dan lobus pulmo sinistra superior dan lobus inferior, selain lobus di dalam paru-paru juga terdapat bronchus, bronkiolus, alveolus dan pleura. Pada bronchus terdapat beberapa jenis sel yaitu sel bersilia dan sel basal, sedangkan dalam bronkiolusterdiri dari sel epitel, otot polos, jaringan ikat (Dellman and Brown, 1992). Pada alveoli banyak terdapat sel epitel, sel alveolar tipe I, alveolar tipe II,

dan makrofag alveolar. Pleura disusun oleh sel-sel epitel dasar dan memiliki dua lapisan yaitu visceral dan lapisan parietalis (Ganong, 1995).

2.4 Karakteristik Sel Paru-paru Fetus Hamster *In Vitro*

Karakteristik sel paru-paru fetus hamster *in vitro* dicirikan dengan morfologi sel yang teratur, berbentuk polygonal dengan batas jelas, sedang sel epitel yang tumbuh di bagian tepi sel selapis yang belum konfluen, mempunyai morfologi yang tidak teratur, bentuk sedikit memanjang, bahkan bila mengalami transformasi bentuknya berubah menjadi fibroblastoid (Trenggono, 2009).

Kultur sel fibroblast pada paru-paru hamster, mempunyai bentuk multipolar atau bipolar menyebar pada permukaan cawan kultur, setelah sel selapis menjadi konfluen sel tersebut menjadi bipolar dan tidak menyebar. Sel fibroblast tersusun sejajar satu sama lain dengan beberapa susunan menyerupai pusaran air yang terlihat dengan jelas (Trenggono, 2009).



Gambar 2.4 Proliferasi Sel Paru-Paru *In Vitro*. a) Kultur Jaringan Paru-Paru Awal Tanam (Sarah, 2008). b) Kultur Jaringan Paru-Paru dengan Pewarnaan Binding Hematoksilin (Nettesheim, 1981).

Sifat sel paru-paru hasil kultur memiliki kemampuan untuk menjadi *cell line*, *cell line* yaitu sel yang diperoleh dari kultur sel primer dan telah dipisahkan secara enzimatis maupun mekanis. *Cell line* dapat terbentuk dari jaringan padat (paru-paru dan epitel) yang pertumbuhannya membentuk sel monolayer (Nettesheim, 1981).

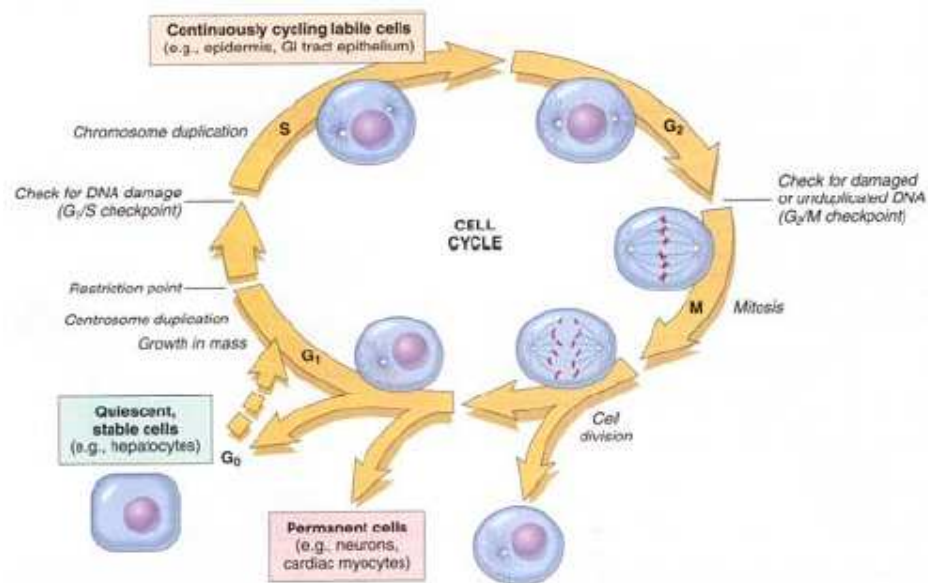
2.5 Proliferasi Sel Paru-paru Fetus Hamster *In Vitro*

Proliferasi merupakan proses pertumbuhan meliputi pembelahan sel secara aktif yang bersifat fundamental dan membutuhkan mekanisme regulasi. Proses ini berjalan dalam suatu mekanisme pengontrolan antara pertumbuhan, diferensiasi, dan apoptosis. Proliferasi sel terjadi dengan melibatkan peristiwa mitosis yang meliputi kondensasi kromatin, pembentukan benang-benang spindel yang melekatkan kromosom pada mikrotubul spindel (Cooper, 2000).

Willey (2005) menyatakan pula bahwa proliferasi sel merupakan pengukuran jumlah sel yang tumbuh dan membelah dalam medium kultur sel secara *in vitro*. Proliferasi sel dibutuhkan untuk beberapa proses termasuk embriogenesis, perkembangan, perbaikan luka, respon imun, dan pergantian sel yang hilang. Banyak dari peristiwa proliferasi sel yang terjadi sebagai respon terhadap adanya faktor pertumbuhan (Albert *et al.*, 1994). Proliferasi sel dapat dipengaruhi oleh suatu stimulus atau ligan. Ligan berikatan dengan reseptor pada membran sel, kemudian mengaktifkan beberapa protein di dalam sel melalui fosforilasi. Transduksi sinyal tersebut diteruskan ke dalam inti sel untuk

mengaktifkan faktor transkripsi yang selanjutnya dapat mengaktifkan siklus sel (Purnomo, 2009).

Siklus sel secara normal terbagi dalam empat fase, yaitu: G_1 , S, G_2 , M dan diselingi dengan fase istirahat yaitu G_0 . Fase awal dimulai dengan (G_1), pada fase ini sel mulai mempersiapkan untuk melakukan sintesa DNA dan juga melakukan biosintesa RNA dan protein. Kemudian dilanjutkan dengan fase S, dimana pada fase ini terjadi replikasi DNA. Pada akhir fase ini sel telah berisi DNA ganda dan kromosom telah mengalami replikasi. Setelah fase (S) berakhir sel masuk dalam fase pra-mitosis (G_2) dengan ciri: sel berbentuk tetraploid, mengandung DNA dua kali lebih banyak dari pada sel fase lain dan masih berlangsungnya sintesis RNA dan protein. Sewaktu mitosis berlangsung fase (M) sintesis protein dan RNA berkurang secara tiba-tiba, dan terjadi pembelahan menjadi 2 sel. Setelah itu sel memasuki fase istirahat (G_0) (Freshney, 2000).



Gambar 2.5 Siklus Sel (Becker, 1986).

Proliferasi sel paru-paru fetus hamster *in vitro* tidak lepas dari siklus kehidupan yang dialami sel untuk tetap bertahan hidup. Siklus ini mengatur pertumbuhan sel dengan meregulasi waktu pembelahan dan mengatur perkembangan sel dengan mengatur jumlah ekspresi atau translasi gen pada masing-masing sel yang menentukan diferensiasinya (Trenggono, 2009).

2.5.1 Konfluensitas Sel Paru-Paru Fetus Hamster *In Vitro*

Sel dikatakan konfluen apabila sel tersebut sudah menempel dan berkembang memenuhi wadah kultur (Djati, 2006). Konfluen sel adalah tumbuh homogen atau meratanya sel sebagai sel monolayer sampai menutupi *cover glass* (Wulandari, 2003). Konfluen sel mengikuti tahap-tahap siklus sel. Siklus sel merupakan proses perbanyakan sel untuk menghasilkan jumlah DNA kromosom yang cukup banyak dan mendukung segregasi yang menghasilkan dua sel anakan yang identik secara genetik. Proses ini berlangsung terus-menerus dan berulang (siklik) (Campbel, 2002)

Siklus ini mengatur pertumbuhan sel dengan meregulasi waktu pembelahan dan mengatur perkembangan sel dengan mengatur jumlah ekspresi atau translasi gen pada masing-masing selnya (Campbel, 2002). Siklus terdiri dari empat proses terkoordinasi, yaitu pertumbuhan sel, replikasi DNA, pemisahan DNA yang sudah digandakan, dan pembelahan sel (Clements, 2001). Pada sel kultur, proses pemisahan DNA dapat terjadi secara bersamaan dengan replikasi DNA, dan peralihan antar tahap siklus sel dikendalikan oleh suatu pengaturan yang tidak hanya mengkoordinasi berbagai kejadian dalam siklus sel namun juga

menghubungkan siklus sel dengan sinyal ekstrasel yang mengendalikan perbanyakan sel (Djuwita, 2002), sehingga perbanyakan sel dapat terjadi dan membentuk ekspansi yang menyebar menutupi substrat.

Sel yang terbentuk dari hasil kultur akan tumbuh mengikuti kurva pertumbuhan yang terbagi dalam 3 tahap yaitu *lag fase*, *log fase* dan *plateu fase* (Trenggono, 2009). Menurut Budiono (2002) perkembangan sel pada masa awal inkubasi belum terdapat peningkatan jumlah sel. Pada masa tersebut konsentrasi sel adalah sama atau hampir sama dengan konsentrasi pada waktu subkultur. Fase ini juga disebut dengan lag fase, yaitu fase sel mengganti elemen-elemen glycocalyx yang hilang waktu tripsinasi, pelekatan pada substrat dan penyebaran sel. Fase selanjutnya yaitu log fase, pada fase ini terjadi peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen, proliferasi akan terhenti. Waktu fase ini tergantung pada konsentrasi awal sewaktu dilakukan seeding, kecepatan pertumbuhan sel, serta kepekatan dimana proliferasi sel akan terhambat oleh kepekatan. Fraksi pertumbuhan pada fase ini mencapai 90 – 100%.

Mendekati akhir dari *log fase*, sel telah konfluen yaitu permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah dipenuhi oleh sel. Kecepatan tumbuh sel akan berkurang dan pada beberapa kasus proliferasi sel akan terhenti. Pada tahap ini kultur mencapai *plateu fase* atau *stationary*, dan fraksi pertumbuhan akan mencapai 0 – 10% (Budianto, 2002).

2.5.2 Viabilitas Sel Paru-Paru Fetus Hamster *In Vitro*

Viabilitas sel merupakan perbandingan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati (Wulandari, 2003). Viabilitas sel menunjukkan respon sel jangka pendek seperti perubahan permeabilitas membran atau adanya gangguan pada jalur metabolisme tertentu dalam sel. Viabilitas sel sering digunakan sebagai penanda sitotoksitas suatu material dan ini berguna untuk mengetahui sifat biologis suatu bahan apakah bersifat toksik terhadap sel tertentu atau tidak. Salah satu yang mengindikasikan sitotoksitas suatu bahan adalah adanya penurunan proliferasi sel dan penurunan viabilitas sel (Freshney, 2000).

Metode yang paling mudah untuk menentukan jumlah sel hidup adalah penghitungan sel dengan menggunakan hemositometer dan menggunakan pewarna *tripan blue* 0,4%, karena *tripan blue* tidak mengubah integritas membran plasma dan memperlambat proses kematian sel. *Tripan blue* juga memperkecil jumlah sel dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop.

2.5.3 Abnormalitas Sel Paru-Paru Fetus Hamster *In Vitro*

Sel dikatakan abnormal apabila sel tersebut mengalami kelainan atau apabila dilihat secara morfologi mengalami perubahan bentuk dari asalnya, yang dapat diakibatkan kontaminasi oleh bakteri dan jamur (Djati, 2006). Abnormalitas sel yang sering muncul pada kultur sel ditandai dengan adanya sel raksasa (*giant cell*) yaitu sel yang volume selnya, DNA, RNA serta massa protein bertambah hingga 20-200 kali lipat daripada sel normal (Freshney, 2000).

Sel dikatakan abnormal apabila sel tersebut berukuran melebihi ukuran sel normal, mengalami perubahan bentuk dari asalnya, dan terkontaminasi oleh bakteri dan jamur (Djati, 2006). Abnormalitas yang sering muncul pada sistem kultur sel adalah adanya sel raksasa (*giant cell*) yaitu sel yang DNA, RNA, volume, dan masa protein sel bertambah hingga 20-200 kali lipat dari sel normal (Freshney, 2000). Ukuran normal sel paru-paru adalah 10 μm (Dixon *et al.*, 1999).

Terjadinya abnormalitas sel pada sel normal diakibatkan oleh adanya beberapa perlakuan dalam kultur sel yang merangsang peningkatan konsentrasi Ca^{2+} yang mengakibatkan protein dalam membrane sel terdegradasi oleh enzim protease dan menyebabkan kerusakan pada sitoskelet serta menurunnya ATP, sehingga membrane sel menjadi rusak dan zat-zat yang berada diluar membran sel baik yang dibutuhkan atau tidak akan mudah masuk kedalam sel. Sel akan mengalami pembengkakan dan volume sel akan bertambah (Pospos, 2005).