

RESEARCH ARTICLE

Viabilitas Hepatosit pada Monokultur 3D Metode Hanging Drop dan Monokultur 2D

Enjelin Sasa Kristanti Hutabarat¹, Christine Verawaty Sibuea², David M. T. Simangunsong³

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan

²Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan

³Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan

Korespondensi: Christine Verawaty Sibuea, Email: christine.sibuea@yahoo.com

Abstract

Background: Liver is a vital organ that has many functions including metabolism, detoxification of toxins and protein synthesis. The prevalence of liver disease is high and the treatment of liver disease continues to develop, so liver models are needed to study liver disease mechanisms and test drug toxicity. Many hepatocyte culture methods are being developed to construct an optimal liver model. The best culture method maintains high hepatocyte viability.

Objective: This study aims to determine the viability of hepatocytes in 3D hanging drop method culture and in 2D culture.

Methods: Hepatocytes were isolated from the liver of Sprague-Dawley rats (n=2) and digested with Trypsin. Primary hepatocytes were cultured using the hanging drop method and conventional (2D) method. Hepatocyte viability was analyzed using the Trypan Blue Exclusion Test.

Results: Hanging drop method had higher viability (81.18%) than the 2D culture method (69.22%) with $p > 0,05$.

Conclusion: The hanging drop method has better viability than the 2D culture method.

Keywords: hepatocyte, viability, 3D culture, 2D culture, hanging drop

Abstrak

Latar belakang: Hati merupakan organ vital tubuh yang memiliki banyak fungsi diantaranya metabolisme, detoksifikasi racun dan sintesis protein. Prevalensi penyakit hati tinggi dan terapi penyakit hati terus berkembang, sehingga model hati sangat dibutuhkan untuk mempelajari mekanisme penyakit hati dan uji toksisitas obat. Banyak metode kultur hepatosit yang terus dikembangkan untuk menghasilkan suatu model hati yang optimal. Metode kultur yang terbaik adalah metode kultur dengan viabilitas hepatosit yang tinggi.

Metode: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas hepatosit pada kultur 3D metode *hanging drop* dan pada kultur 2D.

Hasil: Hepatosit diisolasi dari hati tikus *Sprague-Dawley* (n=2) dan digesti dengan Tripsin. Hepatosit primer tikus dikultur dengan metode *hanging drop* (tetes gantung) dan metode konvensional (2D). Viabilitas hepatosit dianalisa dengan menggunakan *Trypan Blue Exclusion Test*.

Kesimpulan: Metode *hanging drop* memiliki viabilitas yang lebih baik dibandingkan metode kultur 2D.

Kata Kunci: Hepatosit, viabilitas, kultur 3D, kultur 2D, *hanging drop*

Pendahuluan

Hati merupakan organ yang memiliki banyak fungsi vital di dalam tubuh diantaranya fungsi metabolisme, detoksifikasi terhadap racun dan zat berbahaya dan sintesis protein. Hati memiliki kemampuan regenerasi yang baik tetapi apabila terjadi kerusakan hati yang masif dapat mengakibatkan gangguan fungsi hati.¹ Data WHO pada tahun 2019 menunjukkan bahwa angka kematian kegagalan hati pada Sirosis hati dan Hepatocellular carcinoma akibat Hepatitis B berkisar 820.000.² Data CDC tahun 2018 juga menunjukkan bahwa sirosis hati menduduki urutan ke empat penyebab kematian di Indonesia.^{3,4}

Tingginya prevalensi penyakit hati menuntut terus dikembangkannya terapi penyakit hati. Mekanisme penyakit hati dan metabolisme obat yang bekerja pada hati masih banyak yang belum diketahui dengan jelas. Berdasarkan hal tersebut maka dibutuhkan suatu model hati yang dapat dipakai untuk mempelajari mekanisme-penyakit hati dan untuk uji toksisitas obat. Model hati yang terbentuk diharapkan merupakan model hati yang optimal dengan metode kultur yang tepat. Metode kultur yang baik adalah metode dengan viabilitas (kelangsungan hidup) yang tinggi.^{1,5} Banyak metode kultur yang terus dikembangkan, beberapa diantaranya adalah metode kultur konvensional 2D dan kultur 3D. Sel disemai pada permukaan yang datar dan homogen pada kultur 2D.^{6,7,8} Kontak antar sel kurang sehingga sel-sel tersebut mudah mengalami apoptosis.⁹ Metode kultur 3D dapat memberikan lingkungan mikro yang lebih baik sehingga viabilitas sel dapat bertahan lebih lama. Kultur 3D yang sering digunakan dalam kultur hepatosit adalah kultur dengan metode *hanging drop*.¹⁰ *Hanging drop* merupakan salah satu metode kultur 3D yang memanfaatkan gaya gravitasi sehingga memungkinkan adanya kontak antar sel.^{11,12}

Penelitian yang dilakukan oleh Takahashi dkk menunjukkan bahwa kultur 3D sferoid HepaRG dengan metode *hanging drop* mampu menciptakan lingkungan *in vivo* dan peningkatan kadar nilai hati.¹¹ Penelitian ini melakukan kultur hepatosit dengan menggunakan metode *hanging drop*. Kami juga menggunakan medium kultur yang sederhana sehingga kultur ini dapat dilakukan pada daerah dengan akses yang terbatas dan ekonomis. Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan metode kultur hepatosit yang optimal untuk membentuk model hati.

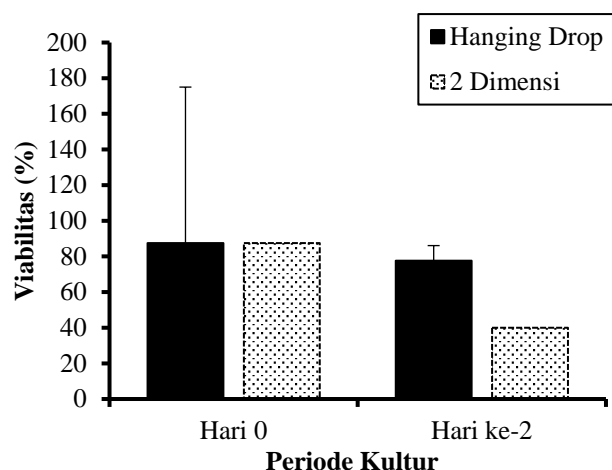
Metode

Hepatosit diisolasi dari hati tikus Sprague-Dawley (225gr, n=2). Hati dipotong-potong menjadi bagian yang kecil dan dilanjutkan dengan digesti menggunakan Trypsin (Gibco). Suspensi sel dicampur dalam AlphaMEM yang disuplementasi dengan 10% PRP dan disentrifugasi 50g selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan medium kultur. Jumlah hepatosit dan viabilitas dianalisa dengan menggunakan *Trypan Blue Exclusion Test*. Sel dihitung dalam kamar hitung *Improved Neubauer*. Suspensi sel ditetaskan ke dalam tutup cawan petri dengan menggunakan mikrotip 10µ sehingga setiap tetesan bervolume 10µ dan mengandung 5000 hepatosit. Setiap tutup cawan petri berisi 20 tetes *hanging drop* dengan total sel sebanyak 100.000. Cawan petri diisi dengan PBS untuk mempertahankan

kelembaban di dalam petri. Tutup cawan petri dibalikkan sehingga tetesan suspensi sel menggantung membentuk *hanging drop*. Suspensi hepatosit yang sama juga dikultur dalam permukaan datar wadah kultur 12 sumur sebanyak 100.000 hepatosit untuk kultur konvensional 2D. Viabilitas hepatosit pada monokultur hepatosit tidak dapat bertahan lama, sehingga kultur 2D dan kultur 3D dipanen pada hari ke-2. Tutup cawan petri dibalikkan seperti awal dan suspensi sel pada dipipet. Analisis viabilitas hepatosit dilakukan dengan menggunakan *Trypan Blue Exclusion Test*. Suspensi sel pada wadah kultur 12 sumur juga dipipet dan dianalisis viabilitasnya dengan menggunakan *Trypan Blue Exclusion Test*.

Hasil

Viabilitas hepatosit dianalisis dengan menggunakan *Trypan blue exclusion test* dan jumlah hepatosit dihitung dengan kamar hitung *Improved Neubauer*. Viabilitas hepatosit kedua metode kultur pada awal penyemaian 86,41% (Gambar 1). Pada hari ke-2, viabilitas hepatosit pada kultur 3D metode *hanging drop* menurun 5,23% sehingga viabilitas hepatosit dengan menjadi 81,18 %, sedangkan pada kultur 2D viabilitas hepatosit menurun 17,19% sehingga nilai viabilitas menjadi 69,22 % (Gambar 1). Viabilitas hepatosit pada metode *hanging drop* lebih besar daripada viabilitas metode kultur 2D ($p > 0.05$).



Gambar 1. Viabilitas Hepatosit pada metode *Hanging drop* dan metode 2D (Viabilitas hepatosit pada metode *hanging drop* lebih besar dibandingkan metode kultur 2D, $p > 0.05$)

Pembahasan

Viabilitas hepatosit pada metode *hanging drop* lebih besar daripada viabilitas kultur 2D. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya interaksi antar sel pada metode *hanging drop*. Metode *hanging drop* merupakan metode yang tidak membutuhkan alat atau cara khusus selain memanfaatkan gravitasi bumi, memungkinkan sel dapat beragregasi dengan bebas. Agregasi bebas hepatosit ini mampu meningkatkan interaksi antar sel selama pertumbuhan hepatosit.¹¹ Dengan demikian, viabilitas hepatosit pada kultur 3D *hanging drop* dalam penelitian ini lebih baik dibandingkan kultur 2D. Menurut penelitian yang dilakukan Ullah dkk, interaksi antar

sel tinggi pada kultur 3D. Ekspresi sinyal penanda apoptosis seperti Bax (*Bcl-2 associated x protein*) pada kultur 3D lebih rendah dibanding kultur 2D, sehingga viabilitas sel lebih baik pada kultur 3D.¹³ Adanya kontak antar sel yang juga mengakibatkan terciptanya lingkungan mikro yang menyerupai *in vivo* pada kultur 3D sehingga pertumbuhan sel meningkat dan viabilitas hepatosit lebih baik.¹⁴ Adanya penggunaan medium PRP pada penelitian ini diyakini mampu mempercepat pertumbuhan sel. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pavlovic dkk yang menyatakan bahwa PRP mengandung faktor pertumbuhan seperti VEGF, EGF, FGF serta protein dan zat lainnya yang mendukung pertumbuhan sel.¹⁵

Penelitian ini memiliki keterbatasan dalam jumlah sel yang dapat dikultur pada metode *hanging drop*. Volume suspensi sel hanya mampu mencapai 50 µl dan hepatosit tidak dapat dikultur dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang lama.^{16,17} Metode kultur 3D lainnya dapat menjadi saran pada penelitian selanjutnya seperti *Ultra-low Attachment (ULA)* dan bioreaktor yang mampu mengkultur sel dalam waktu yang lebih lama dan jumlah sel yang lebih banyak.¹⁸

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian gambaran viabilitas monokultur 3D sferoid hepatosit menggunakan metode *hanging drop* diperoleh kesimpulan bahwa viabilitas monokultur 3D sferoid hepatosit menggunakan metode *hanging drop* lebih baik dibandingkan monokultur 2D metode konvensional.

Daftar Pustaka

- Gilgenkrantz H, Collin de l'Hortet A. Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine. *Am J Pathol*. 2018;188(6).
- Organization WH. Hepatitis B [Internet]. 2019. Tersedia pada: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
- Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Situasi penyakit hepatitis B di Indonesia tahun 2017 [Internet]. Vol. 53. 2017. Tersedia pada : <https://www.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/Infodatin-situasi-penyakit-hepatitis-B-2018.pdf>
- Center for Disease Control. Global health - Indonesia [Internet]. 2018 [dikutip 5 Februari 2020]. Tersedia pada: <https://www.cdc.gov/globalhealth/countries/indonesia/default.htm>
- Fu GB, Huang WJ, Zeng M, Zhou X, Wu HP, Liu CC, et al. Expansion and differentiation of human hepatocyte-derived liver progenitor-like cells and their use for the study of hepatotropic pathogens. *Cell Res*. 2019;29(1):8–22.
- Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs 3D cell Culture. *Am Physiological Soc*. 2017;32.
- Bell CC, Dankers ACA, Lauschke VM, Sison-Young R, Roz Jenkins CR, Goldring CE, et al. Comparison of hepatic 2D sandwich cultures and 3D spheroids for long-term toxicity applications: a multicenter study. *Toxicol Sci*. 2018;162(2).
- Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2016;14(4):911.
- Jia Z, Cheng Y, Jiang X, Zhang C, Wang G, Xu J, et al. 3D culture system for liver tissue mimicking hepatic plates for improvement of human hepatocyte (C3A) function and polarity. *Hindawi BioMed Res Int*. 2020;22.
- Shri M, Agrawal H, Rani P, Singh D, Onteru SK. Hanging drop, a best three-dimensional (3D) culture method for primary buffalo and sheep hepatocytes. *Sci Rep*. 2017;7(1):6–9.
- Takahashi Y, Hori Y, Yamamoto T, Urashima T, Ohara Y, Tanaka H. 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of hepaRG cells. *Biosci*. 2015;35(3):1–7.
- Hurrell T, Ellero AE, Masso ZF, Cromarty AD. Characterization and reproducibility of hepG2 hanging drop spheroids toxicology in vitro. *Sci Elsevier*. 2018;50:86–94.
- Ullah I, Kim Y, Lim M, Oh KB, Hwang S, Shin Y, et al. In vitro 3-D culture demonstrates incompetence in improving maintenance ability of primary hepatocytes. *Animal Cells Syst (Seoul)*. 2017;21(5):332–40.
- Sibuea CV, Pawitan JA, Antarianto R, Jasirwan COM, Sianipar IR, Luviah E, et al. 3D co-culture of hepatocyte, a hepatic stellate cell line, and stem cells for developing a bioartificial liver prototype. *Int J Technol*. 2020;11(5):951–62.
- Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: A short overview of certain bioactive components. *Open Med*. 2016;11:242–7.
- Huang S, Mu F, Li F, Wang W, Chen H, Lei L, et al. Research article a network-based approach to explore the mechanism and bioactive compounds of erzhi pill against metabolic dysfunction- associated fatty liver disease. *J Diabetes Res*. 2020;2020:1–15.
- Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J Stem Cells*. 2019;11(12):1069–70.
- Lauschke VM, Shafagh RZ, Hendriks DFG, Ingelman-Sundberg M. 3D primary hepatocyte culture systems