

RESEARCH ARTICLE

Pengaruh Penggantian Medium terhadap Viabilitas Hepatosit Kultur 3D Organoid Hati

Christine Verawaty Sibuea¹, Jeanne Adiwinata Pawitan², Radiana Antarianto³

¹Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan

^{2,3}Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

^{2,3}Stem Cells and Tissue Engineering Cluster, Indonesian Medical and Education Research

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

Abstract

Background: Liver organoids can be used as materials for Bioartificial Liver, to study the mechanism of liver disease and as drug test toxicity. Reconstruction of liver organoids requires optimal culture methods, culture medium and cellular components to construct liver organoids that resemble liver microstructure in vivo with optimal function. 3D culture method using hepatocytes and stem cells with PRP supplemented William's E can reconstruct liver organoids with liver function. Medium exchange is an usual method to maintain the required nutrients and to eliminate waste products, but it requires a sufficient supply of medium and supplementation. Method and the use of effective and efficient medium with optimal hepatocyte viability are urgently needed in the reconstruction of liver organoids.

Objective: This study was aimed to compare the viability of primary hepatocytes in culture medium exchange liver organoids and monoculture and without culture medium exchange.

Methods: Primary hepatocytes isolated from Sprague Dawley-Rats mice (250gr, n=3) were co-cultured with umbilical cord mesenchymal stem cells, cord blood CD34+ stem cells and LX2 using William's E supplemented by platelet lysate for 14 days. The co-culture was conducted in 96 wells ultralow attachment (ULA). The culture medium was exchanged at 48 hours, day 7 and day 14 and no culture medium exchanged in the control group. Hepatocyte viability was analyzed using the Trypan Blue Exclusion Test at 48 hours, day 7 and day 14.

Results: Hepatocyte viability in culture medium exchange liver organoids was higher than without culture medium exchange, especially in monoculture, but there was no significant difference (p value > 0.05).

Conclusion: Hepatocyte viability in culture medium exchange liver organoids was not significantly different from no culture medium exchange liver organoids. Culture medium exchange in monoculture supported hepatocyte viability up to day 14.

Keywords: hepatocytes, liver organoids, viability, culture medium

Abstrak

Latar belakang: Organoid hati dapat digunakan sebagai bahan *Bioartificial Liver*, mempelajari mekanisme penyakit hati dan uji toksisitas obat. Rekonstruksi organoid hati membutuhkan metode kultur, medium kultur dan komponen seluler yang optimal untuk menghasilkan organoid hati yang menyerupai mikrostruktur hati in vivo dengan fungsi yang optimal. Metode kultur 3D menggunakan hepatosit dan sel punca mesenkimal dengan William's E yang disuplementasi PRP dapat merekonstruksi organoid hati dengan fungsi hati. Penggantian medium merupakan metode yang sering dilakukan untuk mempertahankan nutrisi yang dibutuhkan dan untuk membuang sisa metabolit sel, tetapi membutuhkan persediaan medium dan suplementasi yang cukup banyak. Metode dan

penggunaan medium yang efektif dan efisien dengan viabilitas hepatosit yang optimal sangat dibutuhkan dalam rekonstruksi organoid hati.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan viabilitas hepatosit primer pada organoid hati dengan penggantian medium kultur dan tanpa penggantian medium kultur.

Metode: Hepatosit primer yang diisolasi dari tikus *Sprague Dawley-Rats* (250gr, n=3) diko-kultur dengan sel punca mesenkimal asal tali pusat, sel punca CD34+ asal darah tali pusat dan LX2 dalam William's E yang disuplementasi PRP selama 14 hari. Medium kultur diganti pada 48 jam, hari ke-7 dan hari ke-14 dan tidak dilakukan penggantian medium pada kelompok kontrol. Viabilitas hepatosit dianalisa dengan menggunakan *Trypan Blue Exclusion Test* pada 48 jam, hari ke-7 dan hari ke-14.

Hasil: Viabilitas hepatosit pada organoid hati dengan penggantian medium kultur tampak lebih banyak dibandingkan tanpa penggantian medium kultur khususnya pada monokultur, tetapi tidak terdapat perbedaan yang signifikan (nilai $p > 0,05$).

Kesimpulan: Viabilitas hepatosit pada organoid hati dengan penggantian medium kultur tidak berbeda secara signifikan dengan organoid hati tanpa penggantian medium kultur. Penggantian medium kultur pada monokultur mendukung viabilitas hepatosit hingga hari ke-14.

Kata Kunci: hepatosit, organoid hati, viabilitas, medium kultur

Pendahuluan

Hati merupakan organ yang memiliki banyak fungsi penting di dalam tubuh di antaranya metabolisme, detoksifikasi dan sintesis protein. Hati memiliki kemampuan regenerasi yang baik tetapi apabila terjadi kerusakan hati yang masif dapat mengakibatkan kegagalan hati.^{1,2} Angka kematian kegagalan hati pada sirosis hati dan *hepatocellular carcinoma* akibat hepatitis B berkisar 820.000 menurut data WHO pada tahun 2019 dan prevalensi penyakit hati cukup tinggi.³ Transplantasi hati sebagai terapi utama kegagalan hati memiliki banyak keterbatasan, sehingga terapi alternatif terus dikembangkan.⁴ Organoid hati merupakan salah satu pendekatan yang dikembangkan untuk merekonstruksi bahan Bioartificial Liver, yang akan dapat digunakan sebagai salah satu terapi alternatif.⁵ Organoid hati juga dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme penyakit hati dan uji toksisitas obat.

Rekonstruksi organoid hati dengan viabilitas dan fungsi yang optimal dipengaruhi oleh jenis sel yang digunakan, metode kultur dan medium kultur. Sel punca mesenkimal asal tali pusat dengan kemampuan proliferasi dan plastisitas yang tinggi dapat berdiferensiasi menjadi lini mesenkimal, endodermal dan ektodermal, termasuk *hepatocyte like cell* dan sel non parenkimal serta mendukung viabilitas hepatosit.⁶ CD34 asal darah tali pusat sebagai sel punca hematopoiesis dapat berdiferensiasi menjadi sel endotelial dan berperan dalam regenerasi hati.⁷ LX2 merupakan sel lestari stroma hepatika, bagian dari sel non parenkimal. Ko-kultur sel parenkimal bersama dengan sel non parenkimal dilakukan untuk memperoleh lingkungan mikro yang mendekati hati in vivo. Kultur 3D dengan menggunakan kombinasi hepatosit dengan sel punca merupakan salah satu pilihan metode untuk merekonstruksi organoid hati karena menciptakan lingkungan mikro yang menyerupai hati in vivo.⁸ Dalam penelitian ini, digunakan hepatosit yang merupakan sel parenkimal yang diko-kultur bersama MSC, CD34 dan LX2. Banyak metode kultur yang

dikembangkan untuk dapat merekonstruksi organoid hati dengan viabilitas hepatosit dan fungsi hati yang optimal. Kultur 3D hepatosit menunjukkan fungsi hati yang lebih baik dibandingkan kultur 2D. Adanya interaksi antar sel dan interaksi sel-matriks ekstraseluler pada kultur 3D mendukung fungsi hepatosit.⁹ Wadah kultur *ultralow attachment* memungkinkan terjadinya interaksi antar sel dan pembentukan sferoid.¹⁰ Organoid pada penelitian ini menggunakan hepatosit primer, sel punca mesenkimal, sel punca CD34+ dan sel stroma hepatika yang diko-kultur dengan metode 3D membentuk sferoid dalam *ultralow attachment*. Pemilihan medium dalam kultur akan mempengaruhi viabilitas, proliferasi dan diferensiasi sel yang dikultur.¹¹⁻¹³ Medium kultur yang digunakan pada penelitian ini adalah William's E yang disuplementasi PRP.²

Penggantian medium secara berkala dilakukan pada penelitian sebelumnya untuk mengganti nutrisi di medium dan membuang sisa-sisa metabolisme sel yang dikultur dan sekretom pada medium. Produksi asam laktat kultur sel akan mempengaruhi pH medium, sehingga akan mempengaruhi pertumbuhan sel kultur.¹⁴

Penggantian medium kultur secara berkala membutuhkan biaya yang cukup besar karena membutuhkan medium dan suplementasi yang banyak. Metode kultur yang optimal dan efisien merupakan pilihan yang tepat dalam kultur. Penelitian ini melakukan perbandingan viabilitas hepatosit pada organoid dan monokultur hepatosit dengan penggantian medium dan tanpa penggantian medium. Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan metode kultur organoid yang optimal untuk rekonstruksi organoid hati dengan penggunaan medium kultur yang efisien.

Metode

Organoid 3D direkonstruksi dari kultur hepatosit primer, sel punca mesenkimal asal tali pusat, sel punca CD34+ dan LX2. Hepatosit primer diisolasi dari hati tikus Sprague-Dawley (250gr, n=3). Hati

dipotong-potong menjadi bagian yang kecil dan dilakukan digesti menggunakan Tryple Select (Gibco). Sel punca mesenkimal (MSC) diisolasi dari Wharton's Jelly tali pusat manusia dengan metode eksplant dan telah memenuhi kriteria ISCT (International Society for Cellular Therapy) berdasarkan uji puritas dengan flowsitometri. Sel punca CD34+ diisolasi dari darah tali pusat manusia dan CD34+ diidentifikasi dengan flowsitometri. LX2 yang merupakan sel lestari stelata hepatisa dikultur dan pasase berdasarkan protokol Millipore. Hepatosit primer, MSC, CD34+ dan LX2 diko-kultur triplo dalam medium William's E disuplementasi PRP pada plat ultralow attachment (ULA). Monokultur hepatosit primer juga dikultur triplo dalam medium William's E disuplementasi PRP. Kultur dilakukan selama 14 hari. Medium kultur organoid 3D dan monokultur hepatosit diganti pada 48 jam, hari ke-7 dan hari ke-14 sesuai dengan waktu analisa viabilitas dan pada kelompok kontrol tidak dilakukan penggantian medium kultur organoid 3D dan monokultur hepatosit.

Jumlah hepatosit yang viabel dianalisis dengan menggunakan *Trypan Blue Exclusion Test* pada 48 jam, hari ke-7 dan hari ke-14. Perhitungan viabilitas hepatosit dan morfologi sferoid dilakukan pada organoid 3D dan monokultur dengan penggantian medium kultur dan tanpa penggantian medium kultur triplo.²

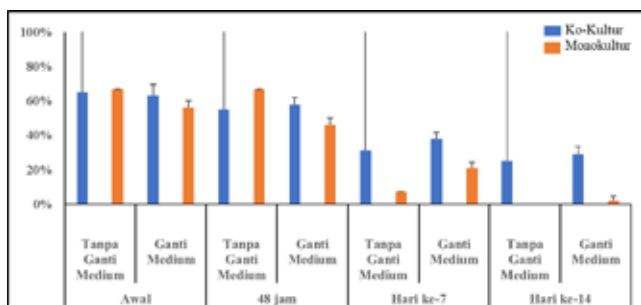
Hasil

Analisis viabilitas hepatosit dilakukan dengan menggunakan *Trypan blue exclusion test* dan jumlah hepatosit dihitung dengan kamar hitung *Improved Neubauer*. Viabilitas hepatosit dengan penggantian medium kultur tampak lebih banyak dibandingkan tanpa penggantian medium kultur, khususnya pada monokultur (Tabel 1), walaupun demikian tidak tampak perbedaan yang signifikan antara keduanya (nilai $p > 0,05$).

Tabel 1. Viabilitas Hepatosit

	Ko-Kultur		Monokultur	
	Tanpa ganti medium	Ganti medium	Tanpa ganti medium	Ganti medium
Awal	65%	63%	67%	56%
48 jam	55%	58%	67%	46%
Hari ke-7	31%	38%	7%	21%
Hari ke-14	25%	29%	0	2%
	$p > 0,05$		$p > 0,05$	

Viabilitas hepatosit pada ko-kultur dengan penggantian medium kultur tidak terlalu berbeda dengan tanpa penggantian medium



Gambar 1. Viabilitas Hepatosit pada tanpa ganti medium dan ganti medium

hingga hari ke-14, tetapi viabilitas hepatosit pada monokultur dengan penggantian medium tampak jauh lebih banyak dibandingkan tanpa penggantian medium pada kultur hari ke-7 dan hari ke-14 (Gambar 1). Viabilitas hepatosit monokultur hari ke-7 sangat kecil dan tidak ditemukan hepatosit yang viable pada hari ke-14 tanpa penggantian medium (Tabel 1).

Pembahasan

Viabilitas hepatosit organoid tidak terlalu berbeda pada penggantian medium dibandingkan dengan tanpa penggantian medium. Berbeda halnya dengan monokultur, dimana viabilitas hepatosit tampak lebih banyak pada penggantian medium dibandingkan tanpa penggantian medium. Hal ini dapat disebabkan karena adanya komponen seluler lainnya yang mendukung viabilitas hepatosit. Sel punca mesenkimal, sel punca CD34+ dan sel stellata hepatisa mengeluarkan sitokin yang dapat mempengaruhi viabilitas hepatosit. Sel punca mesenkimal memiliki efek parakrin dengan mensekresikan sitokin IL-10, transforming growth factor (TGF), Tumor necrosis factor (TNF), hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (IGF) dan insulin-like growth factor (IGF) dan beberapa sitokin lainnya. Efek parakrin ini menurunkan ekspresi B cell lymphoma 2 (Bcl2), Bcl-extra large yang dapat mencegah kematian hepatosit yang diperantarai fas mediated.⁽¹⁵⁾ LX2 juga mensekresikan sitokin yang mempengaruhi hepatosit¹⁶ dan CD34+ juga mendukung viabilitas hepatosit. Adanya kontak antar sel pada ko-kultur juga mempengaruhi viabilitas hepatosit dengan rendahnya ekspresi penanda apoptosis seperti Bax (*Bcl-2 associated x protein*).¹⁷ Penggunaan komponen seluler selain hepatosit dan kontak antar sel mendukung viabilitas hepatosit, sehingga viabilitas hepatosit tetap dipertahankan walaupun tidak dilakukan penggantian medium. Hepatosit tidak memperoleh dukungan viabilitas dari sel lainnya pada monokultur, sehingga viabilitas hepatosit sangat dipengaruhi oleh penggantian medium. Viabilitas hepatosit monokultur hari ke-7 sangat kecil dan tidak ditemukan hepatosit yang viable pada hari ke-14 tanpa penggantian medium menunjukkan bahwa penggantian medium sangat dibutuhkan pada monokultur hepatosit. Penambahan nutrisi dan pembuangan sisa metabolit pada penggantian medium mencegah penumpukan limbah yang menyebabkan kematian sel.¹⁴

Penggantian medium juga tidak terlalu berpengaruh pada viabilitas organoid dapat disebabkan oleh adanya perubahan interaksi antar sel. Penggantian medium mengakibatkan interaksi antar sel terganggu dan sel-sel berusaha mengembalikan komunikasi antar sel pada keadaan medium yang baru.¹⁴ Hal ini dapat mempengaruhi viabilitas hepatosit pada organoid, sehingga viabilitas hepatosit dapat saja terganggu dengan adanya penggantian medium. Penggantian medium seharusnya memberikan nutrisi yang baru dan pembuangan sisa metabolit dan meningkatkan viabilitas hepatosit, tetapi karena adanya perubahan interaksi antar sel mengakibatkan tidak tampak adanya perbedaan viabilitas hepatosit yang signifikan antara penggantian medium dengan tanpa penggantian medium.

Kesimpulan

Viabilitas hepatosit pada organoid dengan penggantian medium kultur tidak berbeda dengan organoid tanpa penggantian medium

kultur, dan penggantian medium pada monokultur hepatosit mendukung viabilitas hepatosit hingga hari ke-14.

Daftar Pustaka

1. Sibuea, CV. Liver deslurazation as liver organoid reconstruction scaffold. *Buletin Farmatera*. 2020; 6(1):6-10
2. Sibuea CV, Pawitan J, 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. *International Journal of Technology*. 2020;11(5):951-62.
3. Monitoring Health for SDGs WHO. 2021. Available at : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342703>
4. Li Y, Wu Q, Wang Y, Li L, Chen F, Shi Y, et al. Construction of bioengineered hepatic tissue derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells via aggregation culture in porcine decellularized liver scaffolds. *Xenotransplantation*. 2017;24(1).
5. Vacanti JP, Kulig KM. Liver cell therapy and tissue engineering for transplantation. *Semin Pediatr Surg*. 2014;23(3):150-5.
6. Zhou Q, Li L, Li J. Stem cells with decellularized liver scaffolds in liver regeneration and their potential clinical applications. *Liver Int*. 2015;35(3):687-94.
7. Ramachandran SD, Schirmer K, Munst B, Heinz S, Ghafoory S, Wolff S, et al. In vitro generation of functional liver organoid-like structures using adult human cells. *Plos one*. 2015;10(10):e0139345.
8. Wang G, Zheng Y, Wang Y, Cai Z, Liao N, Liu J, et al. Co-culture system of hepatocytes and endothelial cells: two in vitro approaches for enhancing liver-specific functions of hepatocytes. *Cytotechnology*. 2018;70(4):1279-90.
9. Tamai M, Adachi E, Tagawa Y. Characterization of a liver organoid tissue composed of hepatocytes and fibroblasts in dense collagen fibrils. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(21-22):2527-35.
10. Kyffin JA, Sharma P, Leedale J, Colley HE, Murdoch C, Mistry P, et al. Impact of cell types and culture methods on the functionality of in vitro liver systems - A review of cell systems for hepatotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro*. 2018;48:262-75.
11. Selenius LA, Lundgren WM, Jawad R, Danielsson O, Bjornstedt M. The cell culture medium affects growth, phenotype expression and the response to selenium cytotoxicity in A549 and HepG2 cells. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(5):130.
12. Chase P, Monckton SRK. Engineered human liver cocultures for investigating drug-induced liver injury. *Drug-Induced Liver Toxicity*. 2018:213-48.
13. Bell CC, Hendriks DF, Moro SM, Ellis E, Walsh J, Renblom A, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci Rep*. 2016;6:25187.
14. Vis MAM, Ito K, Hofmann S. Impact of culture medium on cellular interactions in in vitro co-culture systems. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:911.
15. Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *J Gastroenterol*. 2019;54(9):763-73.
16. Choi YY, Seok JI, Kim DS. Flow-based three-dimensional co-culture model for long-term hepatotoxicity prediction. *Micromachines (Basel)*. 2019;11(1).
17. 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 and Systems*. 2017;21(5):332-40.