

ARTIKEL PENELITIAN

Perbandingan Ko-kultur 2D dan 3D dengan Metode *Hanging Drop* untuk Menghasilkan *Micro-environment* yang Lebih Relevan Secara Klinis

Radiana D. Antarianto,^{1*} Wahyunia L. Septiana,² Melva Louisa,³ Ahmad Aulia Jusuf,¹ Atikah C. Barasila,¹ Jeanne A. Pawitan,¹ Iqbal Fasha⁴

¹Departemen Histologi FK Universitas Indonesia

²Program Magister Ilmu Biomedik, FK Universitas Indonesia

³Departemen Farmakologi FK Universitas Indonesia

⁴Program Magister Ilmu Biomedik FK Universitas Indonesia

Corresponding author: dr.radiana.antarianto@gmail.com

Diterima 22 Mei 2017 ; Disetujui 24 Agustus 2017

DOI:10.23886/ejki.5.7701

Abstrak

Ko-kultur sel 2 dimensi (2D) kurang menyerupai *micro-environment* seperti *in vivo* sedangkan ko-kultur 3 dimensi (3D) membentuk mikromassa yang lebih mirip *micro-environment in vivo* sehingga bermanfaat dalam penelitian biologi dasar. Penelitian ini membandingkan ko-kultur 2D dan 3D sel punca serta sel stelata hepatik dengan metode *hanging drop* untuk menilai morfologi sel dan pembentukan sferoid dari mikromassa yang terbentuk. Studi *in vitro* ini dilakukan di Pusat Virologi dan Kanker Patobiologi (PRVKP) UI dan laboratorium histologi FKUI pada bulan September 2015 sampai Oktober 2016 menggunakan sel punca yang diisolasi dari darah tali pusat manusia dan sel lestari LX2 (stelata hepatik manusia). Darah tali pusat disortir dengan MACS CD34 dan dianalisis flowcytometry. Ko-kultur sel punca sumsum tulang atau darah tali pusat dan LX2 dilakukan dengan metode *hanging drop* untuk ko-kultur 2D dan ko-kultur 3D. Triplikasi eksperimen dilakukan untuk tiap set ko-kultur. Hasilnya menunjukkan terdapat perbedaan morfologi ko-kultur 2D dan 3D *hanging drop* dibandingkan monokultur. Di ko-kultur 2D terdapat mikromassa dan di monokultur 2D tidak terbentuk mikromassa. Di ko-kultur 3D *hanging drop*, terdapat sferoid yang lebih kecil dibandingkan monokultur 3D *hanging drop*. Morfologi sel ko-kultur 2D dan 3D dengan metode *hanging drop* dibandingkan monokultur menunjukkan perubahan fenotip sel-sel yang tergabung dalam mikromassa.

Kata kunci: kultur 2D; kultur 3D; *hanging drop method*; sel punca; mikromassa.

Comparison of 2D and 3D Co-Culture with *Hanging Drop* Method to Produce a More Clinically Relevant Microenvironment

Abstract

2-dimensional (2D) co-cultures show limited resemblance with *in vivo* microenvironment while 3-dimensional (3D) co-cultures form a micromass which is more similar with *in vivo* microenvironment thus it would be more useful in biomedical research. This study was intended to compare 2D co-cultures with 3D co-cultures of stem cells derived from umbilical cord blood vessels and hepatic stellate cells, conducted with *hanging drop* method to assess the cell morphology and the formation of spheroid from the micromass.. This *in vitro* study was conducted at Institute of Human Virology and Cancer Pathobiology (IHVCB) UI and histology laboratory from September 2015 to October 2016 using stem cells which were isolated from human umbilical cord blood (UCB) and LX-2 cell line (human hepatic stellate cells). Human umbilical cord blood was sorted with MACS CD34 and percentage of CD34+ cells were analyzed by flowcytometry. Stem cell co-cultures (UCB) or umbilical cord and L2 was did by *hanging drop* methods for 2D co-culture and 3D co-culture. Triplicates experiments were performed for each set of co-culture. The results showed the difference in the morphology of 2D co-culture and 3D *hanging drop* compared to monoculture. In the 2D co-culture there was a micromass formation, whereas in the 2D monoculture, the micromass was not formed. In the 3D *hanging drop* there was a smaller spheroid compared to the 3D *hanging drop* monoculture. The morphology of 2D and 3D co-culture cells with *hanging drop* method in comparison with monoculture cells showed phenotypic changes of cells which were incorporated together in the micromass.

Keywords: 2D culture; 3D culture; *hanging drop method*; stem cells; micromass formation.

Pendahuluan

Beberapa tahun belakangan ini semakin jelas bahwa kultur 2D dengan sel menempel dan berkembang pada permukaan datar memiliki kekurangan dalam perilaku yang menyerupai *in vivo* jika dibandingkan kultur 3D dalam morfologi atau secara biokimiawi.^{1,2} Hal tersebut merupakan hasil studi dari kohesi sel-sel dan adhesi lapisan sel di kultur *monolayer* menempel pada substrat yang kaku (*rigid*). Sel pada jaringan terkemas dengan sangat erat dalam suatu massa, sel terhubung satu sama lain melalui komponen matriks ekstraselular. Oleh karena itu, secara fisik maupun kimia apa yang dialami oleh sel di kultur 3D sangat berbeda dengan sel yang ditumbuhkan di monokultur. Hal tersebut memengaruhi morfologi dan sinyal sel. Berbagai metode telah dilakukan di kultur sel 3D termasuk enkapsulasi sel di dalam gel kolagen atau *scaffold*. Beberapa metode tidak memperhitungkan adhesi sel dengan sel seperti pada arsitektur jaringan normal.³

Hubungan hasil kultur 2D dengan kehidupan sesungguhnya secara *in vivo* masih dipertanyakan. Perbedaan morfologi sel, polaritas, ekspresi reseptor, ekspresi onkogen, interaksi dengan matriks ekstrasel dan arsitektur sel secara keseluruhan terus dibandingkan antara kultur 2D dengan keadaan *in vivo*. Saat ini terjadi pergeseran metode ke arah 3D karena lebih merepresentasikan apa yang terjadi *in vivo*.³

Tujuan penelitian ini adalah membandingkan gambaran ko-kultur 2D dan 3D *hanging drop* antara sel punca CD34⁺ asal darah tali pusat dengan sel stelata hepatik (LX2) yang teraktivasi. Morfologi sel diuraikan dan pembentukan sferoid dievaluasi dari mikromassa yang terbentuk.

Metode

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* menggunakan sel punca CD34⁺ asal darah tali pusat dan LX2. Studi *in vitro* ini dilakukan di Pusat Virologi dan Kanker Patobiologi (PRVKP) UI dan laboratorium histologi FKUI pada bulan September 2015 sampai Oktober 2016.

Isolasi dan Karakterisasi Sel Punca

Sel punca diisolasi dari darah tali pusat (CD34⁺) yang telah dikriopreservasi dan tersimpan di UPTTK Sel Punca RSCM-FKUI yang dilakukan oleh tim *Cellsafe* dan diproses hingga didapatkan *buffy coat*. Darah tali pusat diproses dengan *ficoll-hypaque* kemudian dilakukan pelabelan dan pemisahan magnetik sesuai protokol MACS

Miltenyi. Sel CD34⁺ dikarakterisasi berdasarkan analisis *flowcytometry* CD34.

Ko-kultur 2D Sel Punca CD34⁺ dan LX2

Kultur 2D menggunakan 96 *well plate* untuk ko-kultur sel punca CD34⁺ dengan LX2 selama 1 dan 2 hari dengan jumlah sel untuk ko-kultur 10.000 sel CD34⁺ dan 10.000 LX2. Kultur 2D menggunakan 24 *well plate* juga dilakukan untuk ko-kultur sel punca CD34⁺ dengan LX2 untuk dikultur selama 3 hari dengan jumlah sel ko-kultur 25.000 sel CD34⁺ dan 25.000 LX2.

Ko-kultur 3D *Hanging Drop* Sel Punca CD34⁺ dan LX2

Suspensi sel punca (CD34⁺) dan suspensi galur LX2 dengan perbandingan 1:1 dari jumlah sel (50.000 sel CD34⁺:50.000 sel LX2) dikultur dengan sistem *hanging drop* sebagai berikut. Pada sistem ini digunakan cawan petri 10cm. Cawan dibuka tutupnya lalu diletakkan 5mL medium kultur (DMEM) atau PBS di bagian bawah cawan kemudian tutup cawan dibuka. Dibuat *drop* dari 1mL berisi suspensi kedua sel (LX2 dan sel hematopoietik) di permukaan tutup cawan menggunakan mikropipet; setiap tutup cawan berisi 20 *drop*. Selanjutnya tutup cawan dibalikkan sehingga menghasilkan tetesan-tetesan (*drop*) yang menggantung dari permukaan tutup cawan (*hanging drop*). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, CO₂ 5%, kelembaban 95%, dan dipanen untuk dianalisis pada hari ke-1, ke-2 dan ke-3. Sebagai kontrol negatif adalah LX2 yang dikultur 3D *hanging drop*.

Hasil Penelitian

Karakteristik Sel Punca CD34⁺

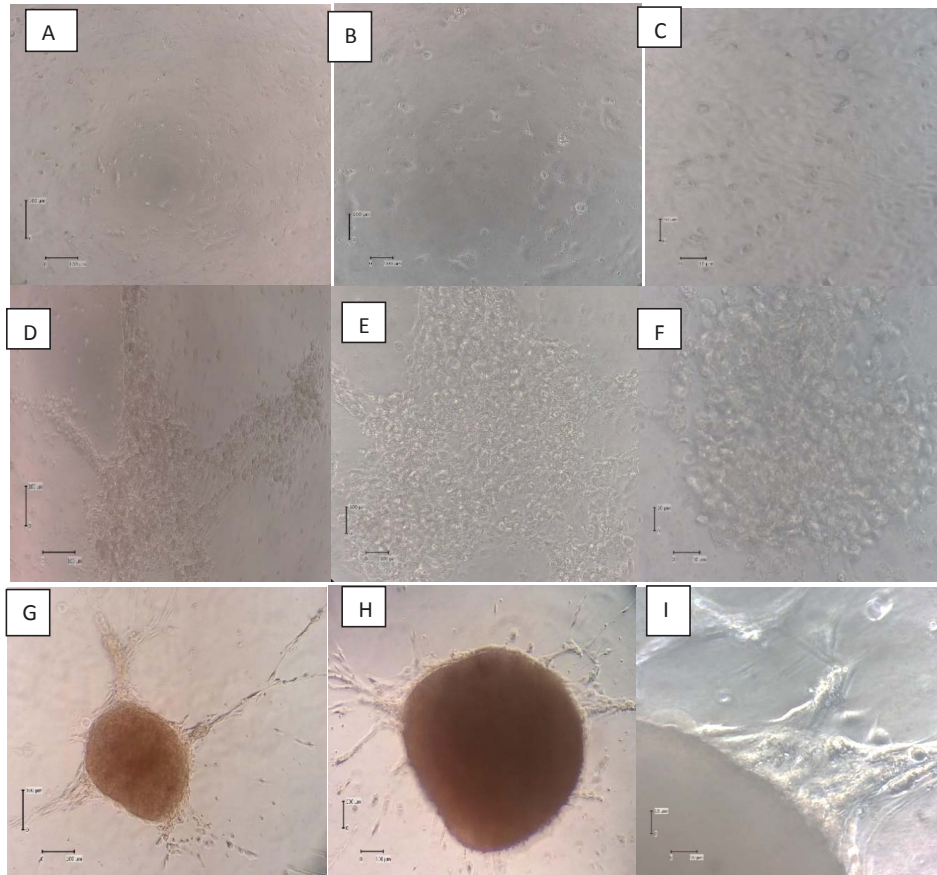
Kultur sel punca asal darah tali pusat menunjukkan morfologi sel satu inti (*mononuclear cell*) berbentuk bulat yang tidak menempel pada wadah kultur dan memberikan gambaran sel yang homogen. Hasil isolasi menggunakan MACS Miltenyi dianalisis *flowcytometri* untuk menilai kemurnian hasil isolasi yang akan menentukan kualitas sel untuk ko-kultur. Sel yang terperangkap di *beads* MACS Miltenyi (CD34⁺) sebanyak 80% yang menunjukkan bahwa sel yang digunakan untuk ko-kultur sudah baik karena didapatkan kemurnian sel CD34⁺ yang tinggi.

Gambaran Ko-Kultur 2D

Gambaran ko-kultur 2D sel punca CD34⁺ dengan LX2 terdapat di Gambar 1. Terlihat perbedaan morfologi antara hari pertama, kedua

dan ketiga. Pada hari pertama kultur, terlihat bahwa sel-sel LX2 mulai melekat di *well* secara tersebar. Pada pembesaran lebih tinggi, terlihat morfologi berbeda antara LX2 dan sel CD34⁺ yang berbeda secara morfologi, yaitu LX2 berbentuk fibroblastik dengan juluran dari sitoplasma, sedangkan CD34⁺ berbentuk bulat dengan ukuran lebih kecil dan tidak melekat di dasar *well*. Pada hari kedua, terlihat

migrasi sel sehingga tampak retraksi sel LX2 yang mulai bermigrasi ke tengah *well* sehingga menunjukkan gambaran menyerupai bintang pada pembesaran lemah. Pada pembesaran lebih tinggi, tampak distribusi LX2 yang lebih padat. Pada hari ketiga, terlihat sel yang lebih padat hingga membentuk mikromassa dan pada pembesaran lebih tinggi, tampak sel seperti akan keluar dari mikromassa.

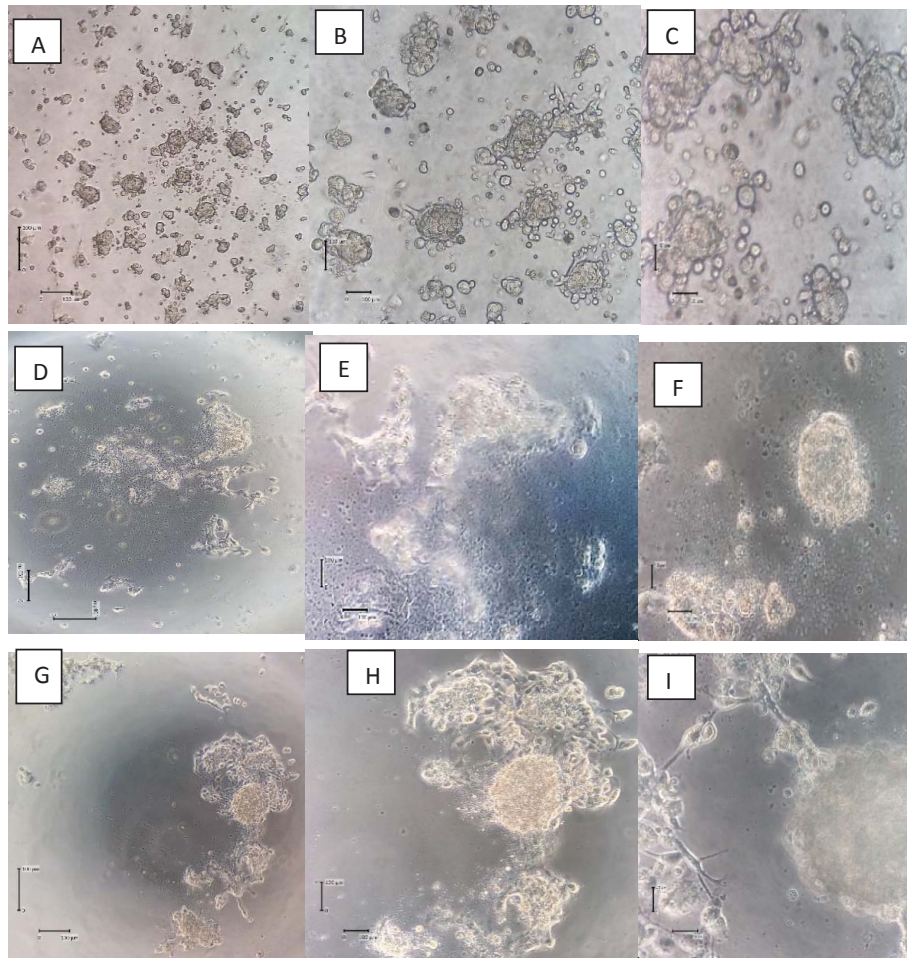


Gambar 1. Ko-kultur 2D LX2 dan Sel Punca CD34⁺ dengan Mikroskop Inversi (A-C) hari pertama: pembesaran 100x (A), 200x (B) dan 400x (C); (D-F) hari kedua: pembesaran 100x (D), 200x (E) dan 400x (F); (G-I) hari ketiga: pembesaran 100x (G), 200x (H) dan 400x (I)

Gambaran Ko-Kultur 3D

Pada ko-kultur 3D *hanging drop* sel punca CD34⁺ tampak morfologi sel yang sangat berbeda jika dibandingkan hasil ko-kultur 2D. Pada ko-kultur 3D *hanging drop* (Gambar 2) hari pertama dapat dilihat bahwa sel mulai berkelompok membentuk agregat yang tersebar di seluruh lapang pandang. Pada pembesaran lebih tinggi, tampak sel CD34⁺

masih mengelilingi LX2. Pada hari kedua terbentuk sferoid yang lebih besar dan dengan perbesaran lebih tinggi tampak agregat sel yang membentuk sferoid. Sel CD34⁺ sulit terlihat pada hari kedua. Pada hari ketiga tampak pembentukan sferoid yang lebih besar pada pembesaran lemah maupun tinggi dan tidak tampak sel CD34⁺ yang mengelilingi agregat sel LX2 seperti pada hari pertama.



Gambar 2. Ko-kultur 3D *Hanging Drop* LX2 Sel Punca CD34⁺ (A-C) hari pertama: pembesaran 100x (A), 200x (B) dan 400x (C); (D-F) hari kedua: pembesaran 100x (D), 200x (E) dan 400x (F); (G-I) hari ketiga: pembesaran 100x (G), 200x (H) dan 400x (I)

Diskusi

Pada penelitian ini didapatkan hasil yang berbeda antara ko-kultur 2D dan 3D *hanging drop*, yaitu morfologi sel dan pembentukan sferoid pada mikromassa yang menunjukkan metode kultur dapat mempengaruhi fenotip dari sel.

Pada ko-kultur 2D antara sel punca CD34⁺ dengan LX2 menunjukkan perubahan morfologi setiap harinya. Pada hari pertama LX2 mulai melekat di wadah kultur dengan distribusi menyebar. Pada hari kedua terlihat migrasi sel berupa retraksi dari pinggir menuju ke tengah wadah kultur hingga memperlihatkan gambaran seperti bintang pada perbesaran rendah. Pada perbesaran lebih tinggi tampak distribusi sel LX2 lebih padat. Pada hari ketiga sel yang beretraksi membentuk mikromassa dan pada pembesaran tinggi sel tampak seperti cabang yang keluar dari mikromassa.

Teknologi mikromassa mulai berkembang dan ditemukan untuk menghindari penggunaan *scaffold*, sehingga sel yang terpisah kembali menyatu. Pendekatan dengan teknologi mikromassa dapat menyerupai pembentukan jaringan yang berasal dari sumber sel yang terpisah satu persatu membentuk kumpulan di lingkungan yang terkontrol. Dengan demikian, rekayasa jaringan yang terbentuk lebih baik dan lebih menyerupai keadaan *in vivo*. Handchel⁴ melakukan kultur 2D osteoblas dan sel endotel yang menunjukkan kultur tersebut dapat membentuk mikromassa dan mengubah matriks ekstrasel yang dihasilkan. Sel-sel yang dikultur dengan teknologi mikromassa akan mengekspresikan komponen matriks ekstraselular yang berbeda di lingkungan mikro.

Selevsek⁵ melakukan analisis proteomik komprehensif di kultur 3D sferoid hati manusia untuk mempelajari toksisitas obat. Hasilnya menunjukkan

bahwa analisis proteomik dari mikro jaringan 3D hati manusia sesuai untuk mempelajari toksisitas obat dan dapat diaplikasikan ke organ lain. Takahashi⁶ menyatakan sistem kultur 3D sederhana tanpa tambahan biomaterial apapun dapat meningkatkan profil gen metabolik karakteristik hati sehingga dapat menjadi metode yang kuat untuk mengetahui respons hati terhadap obat tertentu.

Metode *hanging drop* memiliki kelebihan yakni sederhana, mudah dilakukan, tidak membutuhkan peralatan khusus, dan dapat diamati dengan mikroskop *imaging*. Meskipun demikian sistem kultur tersebut memiliki kekurangan yaitu penanganan dengan sistem tertutup sulit untuk melakukan kultur dalam jangka panjang karena lingkungan cairan sulit dikontrol.⁷

Metode *hanging drop* dengan pembentukan sferoid 3D diadaptasi oleh Kelm et al⁸ menggunakan *aliquot* kecil (biasanya 20µL) dari suspensi sel dengan densitas sel 50, 100, atau 500 sel tergantung ukuran sferoid yang diinginkan, kemudian dibalik dan suspensi sel menjadi *hanging drop* akibat tegangan permukaan. Akumulasi sel di *drop* memungkinkan proliferasi. Level kelembaban diatur menggunakan *dish* yang berperan sebagai *moisture chamber* tempat sel diinkubasi. Metode tersebut dapat menghasilkan satu sferoid setiap *drop*. Kelm et al⁸ yang menggunakan HepG2 dan MCF-7 melaporkan bahwa sferoid yang terbentuk memberikan struktur 3D yang baik dan dapat memproduksi matriks ekstrasel sendiri serta lingkungan yang menyerupai di jaringan (*tissue-like*). Dasar metode tersebut adalah sel beradhesi satu sama lain dan berpegangan di matriks yang terbentuk. Kekurangan kultur itu adalah volume maksimum hanya sekitar 50µL untuk menghasilkan tegangan permukaan yang menjaga cairan tetap menempel di permukaan kultur. Kekurangan lain metode *hanging drop* adalah sulit mengganti medium, karena sulit mengaspirasi sisa medium tanpa mengganggu sferoid yang telah terbentuk.⁹

Pada penelitian ini terdapat keterbatasan yakni pada metode 3D *hanging drop* sederhana menggunakan *petri dish* yang dibalik tutupnya tidak memungkinkan pergantian medium. Pada eksperimen yang dilakukan Schmal¹⁰ menggunakan *plate* khusus, dengan aliran air dapat dilakukan pergantian medium sebagian setiap 2-3 hari sehingga kultur dapat lebih lama.

Metode *hanging drop* merupakan metode sederhana dengan mengkultur sel, meletakkan bergantung dan diinkubasi dalam kondisi fisiologis hingga membentuk sferoid 3D; sel akan kontak

langsung dan membentuk komponen matriks ekstrasel. Metode tersebut tidak membutuhkan peralatan khusus dan dapat diadaptasi termasuk penambahan agen biologis dalam jumlah kecil yang dapat menguraikan efek sel ke sel atau sel terhadap interaksi matriks. Metode tersebut juga dapat dilakukan untuk ko-kultur satu atau lebih populasi sel yang berbeda sehingga dapat menguraikan peran dari sel ke sel maupun sel terhadap interaksi matriks ekstraselular.¹¹

Kohesi antar sel atau interaksi sel dengan matriks ekstraselular merupakan hal penting dalam perkembangan embrionik, interaksi sel stroma dan tumor pada invasi keganasan, penyembuhan luka, serta rekayasa jaringan. Metode sederhana tersebut akan menyediakan agregat sel yang menyerupai jaringan untuk mengukur kandungan biomekanik atau analisis molekular dan biokimiawi untuk analisis pada model fisiologis yang relevan.¹²

Schmal⁹ melakukan eksperimen menggunakan model 3D *hanging drop* untuk meng-ko-kultur sel punca hematopoietik CD34⁺ asal sumsum tulang dengan sel stroma mesenkimal asal sumsum tulang. Ketika ditanam sebagai suspensi sel yang telah dicampur, sel punca mesenkimal melakukan segregasi dan membentuk sferoid padat. Hal tersebut juga ditemukan pada penelitian ini, LX2 membentuk sferoid dikelilingi sel punca CD34⁺ asal darah tali pusat. Schmal¹⁰ juga melaporkan bahwa kultur 3D menunjukkan tingginya ekspresi komponen matriks ekstraselular yang dibentuk oleh sel punca mesenkimal. Hal tersebut juga didapatkan pada penelitian ini, terutama terlihat banyaknya matriks ekstraselular yang terbentuk pada monokultur LX2 dengan model 3D *hanging drop*.

Pada penelitian ini, ko-kultur 3D *hanging drop* pada hari pertama dapat dilihat bahwa sel mulai berkelompok namun masih tersebar. Sel CD34⁺ terlihat masih mengelilingi LX2. Pada hari kedua terbentuk sferoid yang lebih besar dan dengan perbesaran yang lebih tinggi tampak agregat dari sel yang membentuk sferoid. Pada hari ketiga terjadi pembentukan sferoid yang lebih besar pada perbesaran kecil maupun tinggi. Pada kontrol 3D *hanging drop* tampak pembentukan sferoid yang lebih besar pada kontrol dibandingkan ko-kultur. Hal tersebut menunjukkan ko-kultur dengan CD34⁺ menghambat pembentukan sferoid.

Kesimpulan

Morfologi sel pada ko-kultur 2D dan 3D dengan metode *hanging drop* dibandingkan kontrol monokultur menunjukkan perubahan fenotip sel-sel yang bergabung dalam mikromassa.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada PUPT UI yang telah membiayai penelitian ini (hibah riset PUPT UI tahun 2016).

Daftar Pustaka

1. Carvajal C, Lio Q. Translational medicine three-dimensional cell culture models for biomarker discoveries and cancer research. *Transl Med*. 2012;1-8.
2. Rookmaaker MB, Joles JA, Verhaar MC. *Regenerative nephrology*. Burlington: Elsevier Inc.; 2011.
3. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. 2011;20:4-7.
4. Handschel J, Wiesmann HP, Meyer U. Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. *Fundam Tissue Eng Regen Med*. 2009;4:551-5.
5. Selevsek N, Grossmann J, Nanni P, Fortes C, Gunnes P, Kelm J, et al. Comprehensive proteomic analysis of 3D human liver spheroids for drug toxicity investigation. 2013;7(11):2041.
6. Takahashi Y, Hori Y, Yamamoto T, Urashima T, Ohara Y, Tanaka H. Three dimensional (3D) spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *Biosci Rep*. 2015 ;35(3)
7. Millet L, Gillette MU. Over a century of neuron culture: from the hanging drop to microfluidic devices. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2012;83: 501-21.
8. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fusseneger M, Nielsen NK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003;83(2):173-80.
9. Breslin S, Driscoll LO. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):240-9.
10. Schmal O, Seifert J, Schäffer TE, Walter CB, Aicher WK, Klein G. Hematopoietic stem and progenitor cell expansion in contact with mesenchymal stromal cells in a hanging drop model uncovers disadvantages of 3D culture. *Stem Cells International*, 2016.
11. Tung Y-C, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa Y, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 2011;136(3):473-8.
12. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18.