

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hati adalah organ yang melakukan banyak fungsi vital di dalam tubuh. Hati bertanggung jawab dalam proses metabolisme, baik untuk menyimpan nutrisi dan vitamin maupun melakukan detoksifikasi terhadap racun dan zat berbahaya lainnya. Hati juga berperan penting dalam sistem pencernaan, sekresi, dan pembentukan sel darah merah.<sup>1</sup>

Hati merupakan organ yang memiliki kemampuan regenerasi yang baik jika terjadi kerusakan. Pada cedera hati akut, sel hati akan melakukan proliferasi untuk menjaga kelangsungan fungsi organ hati. Kerusakan hati yang tinggi mengakibatkan penurunan kemampuan hati dalam menjaga homeostasis tubuh. Keadaan ini dapat menyebabkan kapasitas regenerasi hati berkurang sehingga kematian sel hati dapat terjadi.<sup>2</sup> Hal ini dapat memicu terjadinya penyakit hati yang dikenal dengan fibrosis, dimana jika kondisi ini berlangsung terus-menerus dapat menyebabkan sirosis hati.<sup>3</sup>

Data WHO tahun 2015 melaporkan bahwa Hepatitis B mengakibatkan sekitar 887.000 kematian di dunia.<sup>4</sup> Prevalensi Hepatitis di Indonesia mengalami peningkatan sebesar 1,2% pada tahun 2013.<sup>5</sup> Data CDC tahun 2018 menyatakan bahwa sirosis hati menduduki urutan keempat penyebab kematian di Indonesia.<sup>6</sup> Riwayat penggunaan alkohol dan obat-obatan, serta obesitas dan diabetes merupakan faktor resiko terjadinya kerusakan hati.<sup>7</sup> Kerusakan hati juga dapat disebabkan oleh infeksi seperti virus Hepatitis dan Ebola.<sup>4</sup>

Peningkatan prevalensi penyakit hati yang terjadi menunjukkan bahwa masih terdapatnya keterbatasan dalam penanggulangan masalah tersebut. Mekanisme penyakit hati yang belum diketahui serta metabolisme obat yang bekerja pada hati sangat penting untuk dipelajari. Berdasarkan hal tersebut maka dibutuhkan suatu model hati untuk mempelajari mekanisme penyakit hati dan untuk uji obat. Rekonstruksi

model hati membutuhkan metode kultur yang baik sehingga dapat dihasilkan suatu model hati dengan viabilitas baik. Sel hati sulit diekspansi secara *in vitro*.<sup>2,8</sup> Hepatosit dalam kultur konvensional pada umumnya juga menunjukkan penurunan polaritas dan viabilitas sel.<sup>9</sup> Keterbatasan inilah yang mendasari para peneliti mengembangkan berbagai metode kultur selasi hepatosit. Beberapa diantaranya adalah kultur 2D (dua dimensi), 3D (tiga dimensi), dan kultur *sandwich*. Kultur 2D menekankan penampakan permukaan datar, menarik para ahli dengan kesederhanaan dan efisiensi yang diberikan. Kelemahan kultur ini, lingkungan bagi pertumbuhan sel kurang mendukung serta dengan kepadatan sel yang rendah menyebabkan morfologi sel tidak terbentuk dengan baik.<sup>10-12</sup> Metode lain yaitu kultur *sandwich* dilakukan mengkultur sel secara berlapis-lapis.<sup>10</sup> Kekurangan kultur ini yaitu rendahnya aktifitas proliferasi karena kurangnya kontak atau interaksi antar sel, sehingga sel-sel tersebut mudah mengalami apoptosis.<sup>13</sup>

Keterbatasan metode-metode tersebut menyebabkan penelitian metode kultur terus berkembang. Penemuan terbaru bergeser pada kultur 3D. Metode ini diteliti dapat mempengaruhi proliferasi, diferensiasi dan viabilitas hepatosit. Kultur 3D yang sering digunakan dalam penelitian organ hati adalah kultur yang membentuk sferoid. Kultur 3D sferoid sangat baik digunakan untuk menguji toksisitas, walaupun masih terdapat keterbatasan dan kekurangan. Kultur 3D sferoid setidaknya sudah mampu memberikan lingkungan mikro yang lebih baik bagi pertumbuhan sel untuk terbentuknya model hati yang memiliki viabilitas yang lebih lama.<sup>14</sup> Metode *Hanging drop* (tetes gantung) merupakan salah satu metode yang pernah digunakan untuk pembentukan sferoid. *Hanging drop* merupakan metode yang memungkinkan adanya ekstraksi bebas sel yang dipengaruhi oleh gaya gravitasi. Sel tersebut dinilai dari waktu ke waktu untuk melihat kepadatan, volume, dan viabilitas yang terbentuk.<sup>15,16</sup>

Penelitian kultur 3D sferoid HepaRG menggunakan metode *Hanging Drop* pernah dilakukan di Jepang pada tahun 2015. Hasil penelitian yang dilaporkan menunjukkan bahwa kultur 3D mampu menciptakan kondisi fisiologis yang sesuai dengan lingkungan *in vivo* serta adanya peningkatan kadar nilai beberapa kandungan yang penting bagi pertumbuhan sel, seperti Albumin dan Apo- $\beta$ . Metode *Hanging drop* sendiri mampu meminimalisir penggunaan alat dan bahan, membuat metode ini dapat memudahkan penelitian yang dilakukan.<sup>15</sup>

Hepatosit yang akan dikultur 3D dengan metode *Hanging drop* dalam penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran viabilitas model hati yang baik. Harapan ini berkembang dengan tujuan agar model hati ini nantinya tidak hanya digunakan dalam memahami metabolisme dan uji toksisitas obat, tetapi juga dapat dipakai untuk mempelajari mekanisme penyakit hati terutama yang belum diketahui.

## **1.2 Rumusan Masalah**

- 1.2.1 Bagaimanakah viabilitas hepatosit yang dihasilkan pada monokultur model hati dengan menggunakan metode *Hanging drop* tersebut?
- 1.2.2 Bagaimanakah pembentukan sferoid hepatosit yang terbentuk dengan menggunakan metode *Hanging drop* tersebut?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan mengkultur hepatosit dengan metode *Hanging drop* yang menghasilkan suatu model hati yang memiliki viabilitas yang baik untuk dapat dipakai mempelajari mekanisme penyakit hati terutama yang belum diketahui dan metabolisme serta uji toksisitas obat.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

- a. Mengetahui viabilitas monokultur 3D sferoid hepatosit yang terbentuk dengan menggunakan metode *Hanging drop*.
- b. Mengetahui pembentukan sferoid hepatosit yang terbentuk dengan menggunakan metode *Hanging drop*.

### **1.4 Manfaat penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat bagi mahasiswa**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan tentang gambaran viabilitas monokultur 3D hepatosit menggunakan metode *Hanging drop*.

#### **1.4.2 Manfaat bagi masyarakat**

Melalui penelitian ini, hasil yang diharapkan dapat berdaya guna bagi bidang kesehatan yaitu dengan menghasilkan model hati yang bukan hanya dapat digunakan untuk mempelajari metabolisme dan uji toksisitas obat, tetapi juga untuk mempelajari mekanisme penyakit hati terutama yang belum diketahui.

#### **1.4.3 Manfaat bagi peneliti lain**

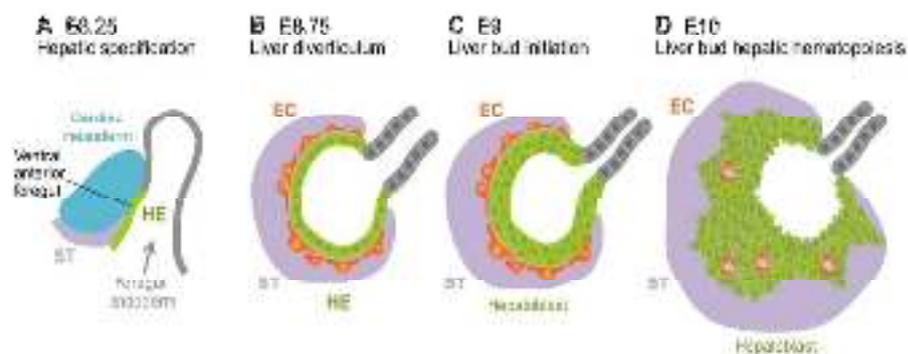
Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan menjadi sumber referensi untuk penelitian lain yang akan dilakukan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Embriologi hati

Perkembangan hati dimulai dari bagian kaudal anterior usus hati pada pertengahan minggu ke 3 dan awal minggu ke 4. Hati memiliki dua jenis sel utama yaitu hepatosit dan kolangiosit. Keduanya berasal dari bagian endodermal yang muncul dari garis primitif anterior dari gastrulasi embrio. Endodermal hati memiliki epitel kubus selapis yang nantinya berubah menjadi epitel kolumnar pseudostratifikasi yang disebut hepatoblas. Hepatosit dan kolangiosit merupakan hasil proliferasi dan difrensiasi dari hepatoblas pada septum transversum. Beberapa faktor yang menandai perkembangan hepatoblas dapat dilihat melalui marker AFP, ALB, HNF $\alpha$ , CK18 untuk hepatosit dan CK19 untuk kolangiosit. Sel-sel ini bermigrasi ke bagian anterior yang akan terpisah dari mesendoderm bipotensial untuk membentuk endoderm definitif. Endoderm definitif ini kemudian akan membentuk tabung yang berputar di sepanjang sumbu anterior-posterior (AP) dan akan membentuk tiga bagian yang terdiri dari *foregut*, *midgut*, dan *hindgut*. Foregut endoderm inilah yang akan membentuk hati, lambung, paru-paru, tiroid dan pankreas bagian ventral.<sup>17</sup>



**Gambar 2.1** Proses pembentukan diverticulum hati dan *liver bud*<sup>17</sup>

Hepatoblas kemudian juga akan berkembang untuk membentuk divertikulum hati (kuncup hati). Pertumbuhan divertikulum hati didukung oleh septum transversum yang berasal dari bagian mesoderm. *Bone morphogenetic protein* (BMP) yang diekspresikan dalam jaringan ikat septum transversum berperan sangat penting untuk perkembangan hati.<sup>17,18</sup>

Hati seorang janin merupakan tempat transisi utama untuk proses hematopoiesis bagi kelompok mamalia. Hal inilah yang menyebabkan hepatoblas dan sel-sel progenitor hematopoietik sudah berkembang sejak saat kuncup hati tikus terbentuk. Ketika kuncup mengembang, satu bagian sel mesotelial yang belum matang mengekspresikan level yang tinggi pada *podocalyxin protein 1* (PCLP1 atau PODXL) yang akan melapisi lobus hati tikus. Hasil dari kultur budaya eksperimen menggambarkan perluasan hepatoblas secara parakrin dan perolehan fenotip yang lebih matang dengan ekspresi mesotelin serta hilangnya PCLP1.<sup>17</sup>

Fungsi metabolik hati ditempatkan khusus pada bagian lobulus hati (zonasi metabolik). Gambaran pematangan hati yang berperan dalam proses glikolitik menjadi glukoneogenik dapat dilihat dalam dua trimester pertama. Pematangan hepatosit akan terus berlanjut setelah lahir. Selama perkembangan hati, beberapa marker yang turut berperan yaitu transformasi faktor pertumbuhan  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Wnt, faktor pertumbuhan fibroblas (FGF), protein morfogenetik tulang (BMP) dan sebagainya.<sup>17</sup>

## **2.2 Struktur anatomi hati dan hepatosit.**

### **2.2.1 Struktur makroskopik hati**

Organ hati terletak di bagian lateral perut yang melintang menuju prosesus xifoideus sekitar 15-20 cm. Berat organ hati orang dewasa berkisar sekitar 1200-1800 gr dan tergantung pada ukuran dan masa tubuh. Secara anatomi hati memiliki empat lobus, yaitu lobus kanan, lobus kiri, lobus kaudatus dan lobus kuadratus. Lobus kanan dan kiri dibagi oleh garis yang terletak disepanjang vena cava inferior-superior yang menuju

fossa kandung empedu inferior.<sup>19</sup> Hati memiliki pembuluh darah utama yaitu vena portal dan arteri hepatica.<sup>20</sup> Vena portal dibentuk melalui vena mesenterika superior dan limpa, sedangkan arteri hepatica terletak disepanjang ligamentum hepatoduodenal yang akan terbagi menjadi dua cabang yaitu kanan dan kiri.<sup>19</sup>

### 2.2.2 Struktur mikroskopik hati

Hati merupakan bagian dari sistem hepatobilier yang terdiri atas parenkim (hepatosit) dan non-parenkim. Struktur parenkim hati berbentuk seperti tali. Sedangkan, bagian non-parenkim terdiri dari endotel, sel epitel bilier, sel kupffer dan sel stelata hepatica. Kedua bagian tersebut bersama-sama membentuk unit heksagonal yang dikenal sebagai lobulus hati yang terdiri dari sekitar 100.000 bagian.<sup>19</sup>

Pembuluh darah utama yang memasok hati adalah vena portal dan arteri hepatica. Vena portal secara berurutan terdiri dari vena interlobar, segmental, interlobular, dan preterminal. Cabang dari arteri hepatica yaitu pleksus preportal dan pleksus prebiliar yang memasok darah ke saluran empedu interlobular serta kapiler yang terdapat disepanjang saluran. Lobulus menerima darah yang kaya nutrisi dari vena porta yang sebagian terdeoksigenasi dari lambung, duodenum, kandung empedu, pankreas, limpa, dan usus kecil. Sedangkan, arteri hepatica memasok darah yang kaya akan O<sub>2</sub> dari dorsal aorta ke lobulus hati. Serangkaian pembuluh darah kapiler yaitu sinusoid terletak disepanjang vena porta sampai arteri hepatica dan akan bertemu di vena sentral.<sup>20</sup>

### 2.2.3 Hepatosit

Hepatosit merupakan unit fungsional dasar yang sangat berperan dalam fungsi metabolik hati. Ukuran hepatosit setiap orang berbeda-beda. Rata-rata hepatosit berdiameter 25-40  $\mu\text{m}$  sedangkan inti selnya berdiameter 10  $\mu\text{m}$ . Inti hepatosit terletak di pusat dan berbentuk bulat. Hepatosit juga mendominasi volume dari parenkim hati yaitu sekitar 80%.

Membran plasma hepatosit terdiri atas tiga domain dengan unsur molekul, kimia, dan antigenik yang berbeda, baik komposisi maupun fungsinya.<sup>21</sup> Hepatosit memiliki banyak organel penting yang terkandung dalam sitoplasmanya.<sup>19,20</sup>

Fungsi hepatosit yang berperan dalam biokimiawi dan pengekspresikan profil gen bergantung pada lokasinya pada lobulus hati. Penelitian terbaru terhadap hati tikus, menemukan bahwa 50 % gen hati terdiri dari zona metabolik yang terdapat pada daerah mid lobular. Glikolisis dan lipogenesis terjadi terutama di hepatosit perisentral. Proses metabolik lainnya seperti sintesis glutamin, asam empedu, urea, albumin serta biosintesis kolestrol juga memainkan peran hepatosit dalam menjalankan fungsinya. Zona metabolik ini berpengaruh terhadap suatu penyakit hati. Hepatosit mengandung hemosiderin dan kandungan tembaga pada saat lahir, dan akan berkurang secara bertahap pada usia 6-9 bulan.<sup>21</sup>

### **2.3 Histologi dan Fisiologi hati**

Hati tersusun secara struktural yang terdiri dari parenkim, vaskular, duktus empedu, dan komponen intestinal lainnya. Unit fungsional hati disebut sebagai lobulus hati atau asinus hati dalam bentuk tiga dimensi. Secara histologi, konsep pembagian asinus tiga dimensi dibagi menjadi tiga zona yang berperan proses oksigenasi dan peredaran darah di saluran portal. Sebagian besar daerah yang kaya akan O<sub>2</sub> mengalir dari cabang terminal vena porta dan arteri hepatic, lalu melalui sinusoid darah dialirkan ke hepatosit yang pada akhirnya akan mengering dibagian asinus perifer. Hepatosit yang berasal dari endoderm mengisi 75-80% volume hati. Sel hati berbentuk heksagonal atau polidehedral dan memiliki sitoplasma eosinofilik yang mengandung inti yang bulat. Beberapa bahan yang terkandung dalam hepatosit yaitu lemak, glikogen, empedu,

*lipofuscin* dan hemosiderin yang tidak selalu terlihat spesifik dalam deferensiasi hepatositik.<sup>22</sup>

Secara fisiologi, hati merupakan organ penting yang bertanggung jawab dalam berbagai fungsi pada tubuh manusia. Hati berfungsi untuk mendukung metabolisme, imunitas, pencernaan, detoksifikasi, penyimpanan vitamin dan fungsi lainnya. Organ ini mengambil peran 2% dari berat badan orang dewasa. Berbagai macam fungsi hati akan dipaparkan pada penjelasan berikut ini.

### 2.3.1 Produksi empedu

Empedu merupakan cairan penting yang membantu mengeluarkan bahan yang tidak dieksresikan oleh ginjal serta membantu penyerapan lemak melalui sekresi garam empedu dan asam. Empedu diproduksi oleh hepatosit dan terdiri dari air, elektrolit, garam empedu, bilirubin dan sebagainya. Empedu yang diekskresikan ke dalam duodenum, akan mengalami sirkulasi enterohepatik untuk menjalankan fungsinya. Empedu yang tidak dieksresikan akan dikonversi untuk dapat digunakan kembali dengan penyerapan oleh illeum dan diangkut kembali ke hati.

### 2.3.2 Penyimpanan dan Metabolisme Vitamin

Sebagian besar vitamin yang larut dalam lemak mencapai hati melalui penyerapan usus dalam bentuk *Very low-density lipoprotein* (VLDL). Vitamin A disimpan dalam sel ito. Vitamin D3 harus menjalani 25-hidroksilasi oleh sistem CYP-450 hati. Hati menerima vitamin E dalam bentuk  $\alpha$  dan  $\gamma$  -tokoferol yang akan mengalami proses ekskresi dan sekresi. Sementara, vitamin K tidak disimpan dan dimetabolisme di hati karena sangat diperlukan untuk  $\gamma$ -karboksilasi faktor koagulasi dan protein.

### 2.3.3 Metabolisme obat

Fungsi lain hati adalah detoksifikasi xenobiotik yang menggunakan lisosom melalui biotransformasi. Reaksi xenobiotik terjadi pada retikulum endoplasma halus hepatosit. Selain itu, dalam metabolisme obat juga terjadi proses konjugasi, salah satunya konjugasi glutation. Penurunan glutation dapat memungkinkan penumpukan metabolit toksik dalam proses detoksifikasi.

### 2.3.4 Metabolisme bilirubin

Hati memainkan peran penting dalam pemecahan heme. Hemolisis terjadi diberbagai tempat termasuk di hati. Heme akan dipecah menjadi biliverdin, yang kemudian direduksi menjadi bilirubin tak terkonjugasi yang nantinya akan terikat pada albumin. Nantinya bilirubin tersebut akan mengalami proses konjugasi melalui sistem *uridine diphosphate glucoronyltransferase* (UGT) yang akan dieksresikan melalui empedu dan sebagian besar melalui tinja karena tidak dapat diserap oleh dinding usus.

## 2.4 Penyakit Hati

Penyakit hati merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia. Data CDC tahun 2018 turut melaporkan bahwa sirosis hati menduduki urutan ke empat penyebab kematian di berbagai negara.<sup>6</sup> Prevalensi Hepatitis di Indonesia sendiri mengalami peningkatan sebesar 1,2% pada tahun 2013.<sup>5</sup> Penyebab penyakit hati sering disebabkan oleh adanya infeksi dari mikroorganisme seperti virus atau riwayat penggunaan alkohol dan obat-obatan jangka panjang.<sup>7</sup> Beberapa contoh penyakit hati seperti Hepatitis, yaitu peradangan hati yang diakibatkan karena infeksi virus atau zat penyebab lainnya.<sup>23</sup> Penyakit hati yang sering juga terjadi yaitu Sirosis hati, merupakan keadaan hilangnya sel hati yang digantikan dengan jaringan parut yang bersifat ireversibel yang dapat memperburuk

fungsi hati. Sirosis hati dapat disebabkan oleh alkohol serta virus hepatitis B dan C.<sup>24</sup>

Kondisi ketika sel hati tumbuh secara abnormal diluar kendali organ dapat menyebabkan Kanker dan Hepatitis. Karsinoma hepatoseluler merupakan jenis kanker hati yang paling umum. Kanker yang berasal dari hati ini menyebabkan fungsi metabolisme hati dapat terganggu.<sup>25,26</sup> Tanda dan gejala pada penyakit hati dapat bervariasi, tetapi yang paling umum dijumpai yaitu mata dan permukaan kulit tanpa menguning, pembengkakan perut dan kaki, mudah memar, perubahan warna tinja dan urin, bahkan dapat juga tanpa gejala. Penegakan diagnosis penyakit hati dapat ditunjang dengan beberapa pemeriksaan, yaitu CT-scan, USG, biopsi liver, tes fungsi hati dan pemeriksaan lainnya.<sup>27</sup>

Mekanisme patologis penyakit hati sebagian besar menjelaskan adanya peran stress oksidatif, preoksidasi lipid, peradangan, dan gangguan respon imun. Menanggapi hal tersebut, ternyata masih banyak ketidakseimbangan patogenesis yang terjadi, seperti proses peradangan pada hati. Serangkaian reaksi molekuler dan seluler dalam mekanisme juga belum sepenuhnya dipahami dan dapat diselesaikan.<sup>28</sup>

Hati sendiri merupakan organ sentral yang bertanggung jawab atas metabolisme obat-obatan dan bahan kimia beracun. Berbagai macam mekanisme penyakit hati yang ada menuntut terapi yang mampu bekerja pada target terapeutik yang luas. Cidera hati akibat intoksisitas obat merupakan masalah klinis yang penting saat ini. Lebih dari 900 obat yang mempengaruhi hati secara langsung. Baicalin, flavonoid *radix Scutellariae* yang diinduksi oleh Acetaminophen, secara efektif dapat meredakan cidera hati. Kebutuhan obat yang aman dan efektif demi memberikan hepatoprotektif terhadap hati sangat diperlukan.<sup>28</sup> Untuk itulah diperlukan suatu rekonstruksi organoid hati yang diharapkan dapat menjadi wadah untuk mempelajari mekanisme penyakit hati yang belum

diketahui pasti maupun dalam metabolisme dan uji toksisitas obat-obatan yang bekerja pada hati.

## **2.5 Metode kultur dan pembentukan sferoid hepatosit.**

Kultur sel telah menjadi alat yang sangat diperlukan untuk mengungkap mekanisme biofisik dan biomolekuler dasar dari jaringan suatu organ. Dalam penelitian biomedis, kultur sel banyak digunakan untuk rekayasa jaringan, praktik industri dan sebagainya. Kultur sel *in vitro* kerap diterapkan untuk meningkatkan pemahaman dasar sel secara *in vivo*. Hal ini termasuk diferensiasi, pertumbuhan dan mekanika sel. Semua hal ini dipengaruhi oleh lingkungan mikro yang diciptakan baik secara biokimia maupun biomekanik.<sup>10</sup>

Monokultur yang merupakan teknik kultur dengan penanaman satu sel tunggal juga berkembang menjadi berbagai macam metode kultur. Kultur 2D (dua dimensi) yang telah mendominasi tidak menutup kemungkinan bergesernya penelitian terbaru menggunakan kultur 3D (tiga dimensi) yang memberikan lingkungan mikroseluler lebih menjanjikan. Kultur yang banyak digunakan sebagai model *in vitro* untuk mempelajari respon seluler. Namun, secara signifikan banyak bukti yang menunjukkan sistem 2D dapat menghasilkan bioaktivitas sel yang menyimpang pada lingkungan respon *in vivo*.<sup>10</sup>

Untuk mengatasi keterbatasan ini, metode 3D yang menginduksi kultur sferoid hadir untuk mengupayakan kondisi *in vivo* yang lebih baik. Hasil studi 3D yang diteliti menunjukkan bahwa meningkatnya dimensi matriks ekstraseluler (ECM) secara signifikan mempengaruhi proliferasi, diferensiasi, respon mekanik, dan viabilitas sel. Berikut akan dibahas mengenai beberapa metode kultur beserta kekurangan dan kelebihanannya.<sup>10</sup>

### 2.5.1 Kultur tiga dimensi (3D) dan pembentukan sferoid.

Sistem 3D merupakan kultur yang membentuk lingkungan mikro tiga dimensi dan tersusun atas distribusi matriks ekstraseluler menjadi prilaku dasar dan merangkum fungsi organ. Pendekatan kultur sel 3D bertujuan untuk membentuk suatu model yang dapat berinteraksi secara *in vivo*.<sup>10</sup> Secara umum, kultur 3D memberikan keuntungan yaitu, dapat memungkinkan meniru lingkungan mikro seluler *in vivo*, dapat bertindak sebagai model untuk mempelajari kondisi patofisiologis dan lebih realistis untuk menumpuhkan sel dalam budaya 3D untuk mempelajari efek dosis obat sebagai lapisan antar sel. Penyediaan sinyal biofisika dan biokimia yang diciptakan sangat mempengaruhi tingkat migrasi, adhesi, proliferasi dan ekspresi gen juga diberikan dibandingkan kultur 2D. Interaksi antar sel-sel disekitarnya sangat mempengaruhi terbentuknya lingkungan yang mirip dengan kondisi *in vivo*. Salah satu teknik kultur 3D yang paling sering digunakan dalam penelitian organ hati adalah kultur sferoid.<sup>14</sup> Salah satu penelitian pembentukan sferoid menunjukkan bahwa, hasil akhir biakan sel berbentuk bulat dan memanjang.<sup>29</sup> Sistem kultur sferoid diteliti juga mampu menyediakan lingkungan yang lebih menyerupai *in vivo*, mempertahankan sifat fenotipik sel dan adanya interaksi antar sel yang mengatasi keterbatasan kultur monolayer sangat mempengaruhi viabilitas sel yang dikultur.<sup>30</sup> Penerapan kultur 3D sferoid yang telah diteliti dapat digunakan untuk pengujian toksistas rutin. Walaupun sebagian besar studi kultur sferoid menggunakan HepG2 bukan hepatosit primer.<sup>14</sup>

### 2.5.2 Kultur dua dimensi (2D)

Kultur sel 2D bergantung pada penampakan permukaan yang rata. Pertumbuhan sel dalam lapisan tunggal 2D memungkinkan pasokan jumlah nutrisi dan faktor pertumbuhan yang sama dalam medium, sehingga didapati pertumbuhan yang homogen. Hal ini yang sempat menarik para ahli biologi secara kesederhanaan dan efisiensinya. Namun,

bentuk sel yang tidak terkontrol terkadang diberikan oleh metode ini yang nantinya mempengaruhi bioaktivitas sel secara *in vivo*. Sistem 2D ini juga menginduksi polaritas sel sehingga dapat mengubah fungsi asli dan lingkungan mikro sel. Efek polarisasi ini dapat dikurangi dengan metode kultur *sandwich* yang menambah lapisan matriks ekstraseluler.<sup>10</sup>

Kultur *sandwich* dilakukan dengan cara mengkultur sel secara berlapis-lapis. Kultur ini telah lama terbukti menghasilkan kultur hepatosit yang morfologi dan fungsinya lebih akurat bagi lingkungan *in vivo*. Teknik kultur lain dari 2D yaitu pola mikro dan perubahan kekakuan media. Kekurangan metode ini menyebabkan turunnya kapasitas detoksifikasi.<sup>10,31</sup> Aktifitas proliferasi yang rendah karena kurangnya kontak atau interaksi antar sel juga merupakan kelemahan dari kultur *sandwich*, hal ini dapat menyebabkan sel-sel yang dikultur akan rentan mengalami apoptosis karena kelangsungan hidup yang tidak bertahan lama.<sup>13</sup>

### 2.5.3 Metode *Hanging drop*

*Hanging drop* (tetes gantung) merupakan metode yang membentuk sel dengan menggunakan gaya gravitasi bumi yang akan membuat sel bermigrasi dengan polaritas dalam matriks ekstraseluler yang luas seperti pada jaringan *in vivo*. Kelebihan dari metode ini yaitu tidak memerlukan bahan atau peralatan khusus.<sup>15</sup> *Hanging drop* merupakan salah satu metode dari kultur sferoid, dimana volume dan kepadatan sel ikut mengontrol ukuran sferoid yang terbentuk. Suspensi sel yang diteteskan pada permukaan platform akan ditutup dan dibalikkan. Dengan ini sferoid akan terbentuk akibat bantuan tegangan permukaan platform dimana sel menempel serta adanya peran dari gaya gravitasi.<sup>30,32</sup> Metode ini pernah digunakan untuk melihat karakteristik dan reproduktifitas sferoid HepG2. Sel-sel ini dikultur dengan metode *Hanging drop* dan dinilai dari waktu ke waktu untuk melihat morfologi, viabilitas, distribusi siklus sel, serta

kandungan lipid dan protein. Metode ini diteliti memungkinkan adanya ekstraksi bebas antar sel selama eksperimen. Dari pembahasan penelitian, pengendapan dengan bantuan gaya gravitasi, dinilai cukup baik untuk mendorong terbentuknya agregasi maktrijs ekstraseluler (ECM) yang penting untuk morfologi sel.<sup>16</sup>

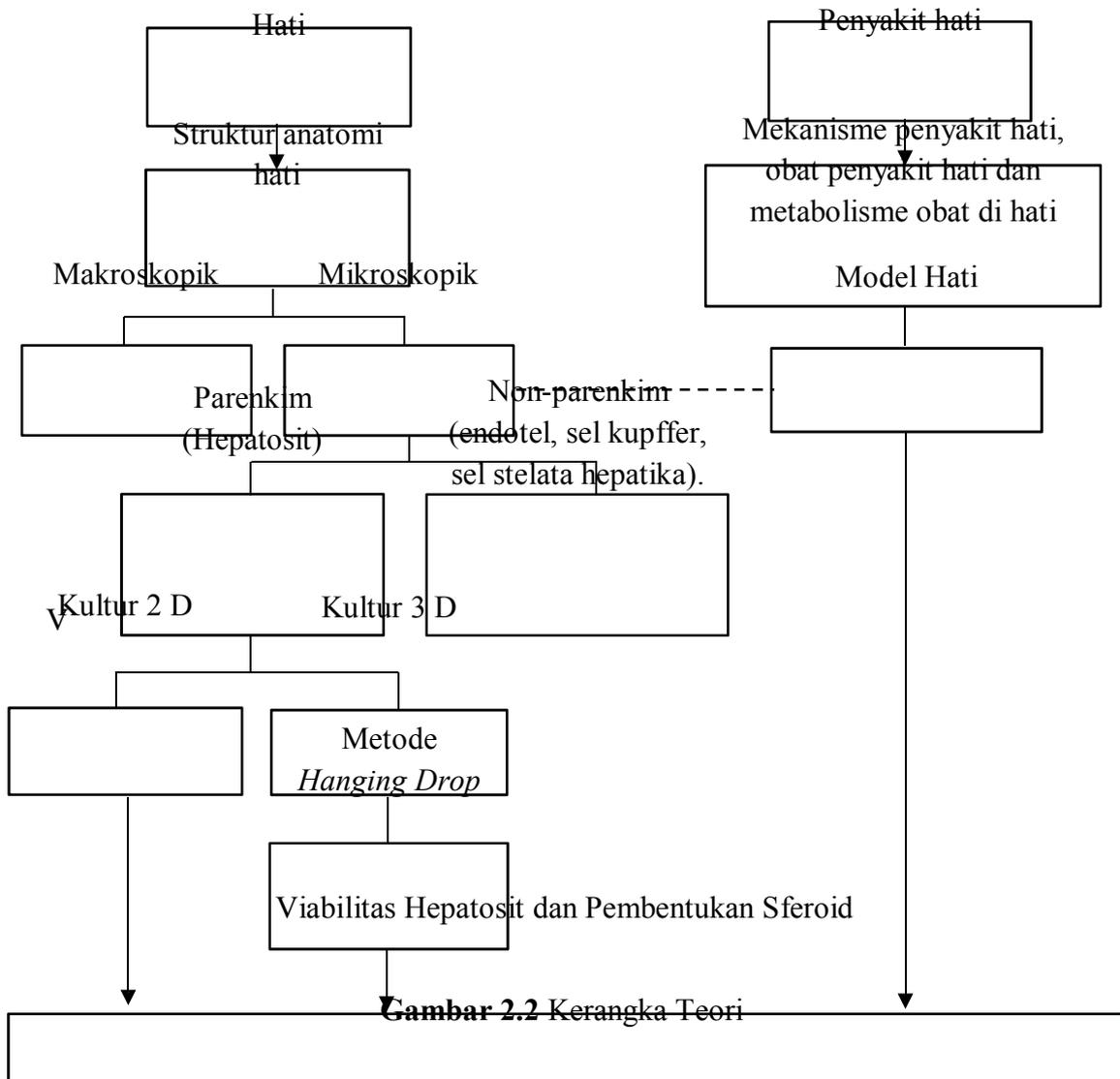
Penelitian sferoid HepG2 juga pernah dilakukan di Jepang menerapkan metode *Hanging drop* dengan kultur 3D. Hasil menunjukkan bahwa adanya peningkatan karakteristik hepatoseluler yang diharapkan dapat meningkatkan aktivitas metabolisme hati, yang pada akhirnya dapat digunakan untuk studi fungsional dan farmakologis pengembangan obat.<sup>15</sup>

## 2.6 Viabilitas Hepatosit

Viabilitas merupakan kelangsungan atau presentase sel dapat bertahan hidup, hal ini sangat penting dalam studi biologi. Penilaian viabilitas sering dan perlu dilakukan untuk kultur 3D, seperti sferoid dan organoid yang bertujuan baik untuk pengobatan maupun mempelajari karakteristik organ. Uji *trypan blue* masih merupakan metode pengukuran yang masih banyak digunakan untuk menilai viabilitas sel. Proses akhir penilaian adalah dengan memperkirakan populasi sel, yaitu jumlah total sel yang masih sehat atau hidup.<sup>30</sup>

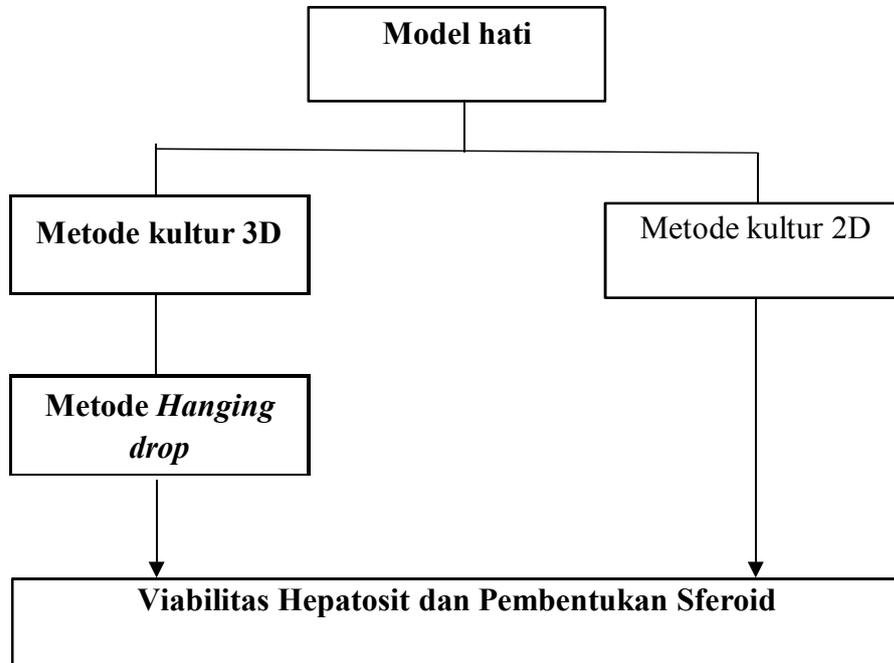
Beberapa faktor yang dapat memengaruhi jangka pendek atau panjangnya viabilitas yaitu kepadatan suatu sel, efek dan dosis obat, morfologi sel yang dapat cukup signifikan mempengaruhi persinyalan molekuler.<sup>33</sup> Viabilitas sel juga sangat bergantung pada lingkungan mikro yang diberikan dalam mengupayakan kondisi asli untuk pertumbuhan sel serta kontak antar sel yang mempengaruhi proliferasi dan resiko sel mengalami apoptosis.<sup>12,13</sup>

## 2.7 Kerangka teori



Gambar 2.2 Kerangka Teori

## 2.8 Kerangka Konsep



Gambar 2.3 Kerangka Konsep

## **BAB III METODOLOGI**

### **PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif eksperimental dengan tahapan sebagai berikut:

##### 3.1.1 Isolasi hepatosit

##### 3.1.2 Monokultur hepatosit dengan metode *hanging drop* dan menganalisa :

- a. Viabilitas sel
- b. Pembentukan sferoid hepatosit

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **3.2.1 Tempat Penelitian**

a. Tahap I Maret 2021 : Isolasi hepatosit di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran HKBP Nommensen

b. Tahap II Maret 2021 : Monokultur 3D sferoid hepatosit di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran HKBP Nommensen

##### **3.2.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret 2021.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### 3.3.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan penelitian yang diperlukan selama penelitian di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran HKBP Nommensen dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

<b>No.</b>	<b>Alat dan Bahan</b>	<b>Justifikasi Pemakaian</b>	<b>Kuantitas</b>
1.	AlfaMEM	Medium Kultur	1 botol
2.	<i>Cap</i>	Aseptik	2 box
3.	<i>Cell strainer</i>	Isolasi Hepatosit	1 box
4.	Filter 0.2 Micr	Filtrasi bahan	1 boks
5.	Flask 25 cm <sup>2</sup> (Nune)	Scale up-kultur, pasase	1 pack
6.	Fungizone	Antifungal kultur	100 mL
7.	Glutamax	Suplemen kultur	100 mL
8.	<i>Hand seal</i>	Aseptik	1 boks
9.	Masker	Aseptik	1 boks
10.	PBS	Isolasi, washing	1 pack
11.	PenStrep	AB kultur	100 mL
12.	PRP	Kultur	100 mL
13.	Spuit 10 ml	Filtrasi bahan	1 boks
14.	Spuit 20 cc	Filtrasi bahan	1 boks
15.	Spuit 5 cc	Filtrasi bahan	100
16.	Tip 10 micro	Hitung sel	1 boks
17.	Tip biru	Buat medium, kultur, panen	1 boks
18.	Tip kuning	Buat medium, kultur, panen	1 boks
19.	<i>Trypan blue exclusion test.</i>	Isolasi	100 mL

20. Tube 15 ml	Wadah steril, tabung sentrifugasi	1 pack
21. Tube 50 ml	Wadah steril, tabung sentrifugasi	1 pack
22. Mikroskop binokuler	Melihat viabilitas hepatosit dan pembentukan sferoid hepatosit	1 buah

---

**Tabel 3.1** Alat dan Bahan Penelitian

### 3.3.2 Hepatosit

Hepatosit diisolasi dari organ hati *Sprague-Dawley rats* jantan dewasa (250-350 gr)

## 3.4 Sampel dan Besar Sampel

### 3.4.1 Sampel Penelitian

Hepatosit diisolasi dari organ hati *Sprague-Dawley rats* jantan dewasa (250-350 gr), n=2.

## 3.5 Prosedur Penelitian

### 3.5.1 Isolasi Hepatosit dari Hati *Sprague-Dawley rats*

Jaringan hati dicuci dengan PBS dingin untuk membersihkan sisa darah yang mengkontaminasi. Hati dipotong dengan pisau bedah menjadi lembaran tipis dengan ketebalan sekitar 1-2 mm, dan dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Jaringan hati dipindahkan ke botol 100 mL dan digesti dilakukan dengan menggunakan *Tryple Select* (300 U/mL dalam 20 mL PBS) pada 37°C dengan vortex intermiten dalam 30 menit, dan supernatant dibuang. Sisa jaringan hati dipindahkan ke tube 50 mL yang mengandung 20 mL *Tryple Select* dan digesti dilanjutkan hingga 4 kali. Digesti tripsin disaring dengan 100 *micron nylon mesh filter* dan dicampurkan ke dalam 20 mL AlfaMEM + PRP untuk menghentikan digesti. Campuran disentrifugasi 50 g selama 4 menit, selanjutnya

sepertan dibuang dan pellet diresuspensi dalam AlfaMEM + PRP. Konsentrasi PRP yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan PRP 10%.<sup>34</sup> Jumlah dan viabilitas sel dihitung dengan *trypan blue exclusion test*. Semua proses dilakukan dalam *laminar flow* dengan kondisi steril.<sup>35</sup>

### 3.5.2 Monokultur 3D Hepatosit dan Analisa Viabilitas Hepatosit

Hepatosit dikultur dengan menggunakan metode *Hanging drop*. Hepatosit juga dikultur dengan metode 2D sebagai kontrol. *Hanging drop* (tetes gantung) merupakan metode yang membentuk sel dengan menggunakan gaya gravitasi bumi. Metode kultur *hanging drop* dilakukan dengan meneteskan suspensi sel pada cawan petri dan kemudian cawan petri dibalikkan sehingga tetesan suspensi sel menggantung dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C. Volume dan kepadatan sferoid yang terbentuk dibantu oleh tegangan permukaan *platform* dimana sel menempel.

Sedangkan metode 2D hanya bergantung pada penampakan permukaan yang rata dengan pertumbuhan sel yang homogen. Platform pada metode ini tidak perlu dibalikkan, sehingga volume sel tidak terbentuk. Metode ini dilakukan dengan menanamkan suspensi sel pada plat kultur 6 sumur. Salah satu bentuk metode 2D yaitu kultur *sandwich* yang dilakukan dengan cara mengkultur sel secara berlapis-lapis pada matriks ekstraseluler (ECM). Monokultur diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dan kelembapan 95%. Analisa viabilitas hepatosit dilakukan pada hari ke-2.

Analisa viabilitas hepatosit diperoleh dengan menggunakan *trypan blue exclusion test*. Analisa viabilitas sel dilakukan pada hari ke-1 dan ke-2. Sel dihitung dalam kamar hitung *Improved Neubauer*. Suspensi sel akan dicampur dengan *trypan blue*. Kerja dari uji *trypan blue exclusion test* yaitu, sifat dari zat warna *trypan blue* akan mengikat sel yang rusak, yang berarti sel yang mati. Sedangkan sel yang hidup akan tetap meniru

warna asli sel. Sel harus dihitung dalam waktu 3 sampai 5 menit setelah pencampuran dengan *trypan blue*, jika terlalu lama akan dapat menurunkan viabilitas sel. Kedua sel akan dihitung pada kamar hitung neubauer baik yang hidup dan yang mati. Perhitungan persentase sel yang hidup dapat menggunakan rumus berikut :

**Bentuk kamar hitung :**

1	5	2
6	7	8
4	9	3



**Gambar 3.1** Penampakan kamar hitung *Improved Neubauer*

**Rumus perhitungan viabilitas sel :**

$$\begin{array}{l} \text{Jumlah sel yang hidup} = \\ \frac{\text{Jumlah sel yang hidup di 9 kotak}}{9} \times 2 \times 10^4 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \downarrow \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{(Dilusi)} \end{array}$$

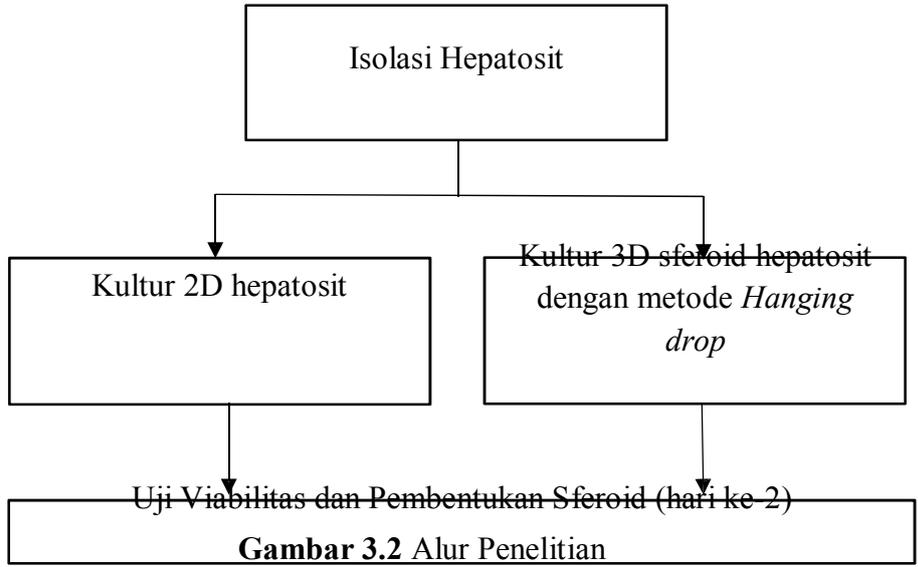
$$\begin{array}{l} \text{Jumlah sel yang mati} = \\ \frac{\text{Jumlah sel yang mati di 9 kotak}}{9} \times 2 \times 10^4 \end{array}$$

$$\text{Viabilitas sel} = \frac{\text{Jumlah sel yang hidup}}{\text{Jumlah sel yang hidup} + \text{Jumlah sel yang mati}} \times 100 \%$$

**3.5.3 Pembentukan Sferoid**

Pembentukan sferoid dilihat dibawah mikroskop binokuler dari hasil kultur 3D menggunakan metode *hanging drop* dan kultur 2D.

**3.6 Alur Penelitian**



**Gambar 3.2** Alur Penelitian

**3.7 Identifikasi Variabel**

Variabel penelitian :

1. Viabilitas hepatosit
2. Pembentukan sferoid

### 3.8 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara ukur	Skala ukur
Viabilitas	Viabilitas	Kamar	Analisa viabilitas	Numerik
hepatosit	merupakan kelangsungan atau presentase sel dapat bertahan hidup, hal ini sangat penting dalam studi biologi Hepatosit merupakan unit fungsional dasar yang sangat berperan dalam fungsi metabolik hati.	hitung <i>Improved Neubauer</i>	hepatosit diperoleh dengan analisis viabilitas hepatosit menggunakan <i>trypan blue exclusion test</i> dan sel yang hidup akan dihitung dalam kamar hitung <i>Improved Neubauer</i> .	(Hasil ukur) Jumlah sel hidup / (Sel hidup + sel mati) x 100%
Pembentukan Sferoid	Kultur 3D yang menyediakan lingkungan yang lebih menyerupai <i>in vivo</i> , dengan mempertahankan sifat fenotipik sel dan adanya interaksi antar sel.	Mikroskop binokuler	Pembentukan sferoid dilihat dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 10x dan 40x	Kategorik (Hasil ukur) Agregat sel berbentuk sferis

<i>Hanging drop</i>	<i>Hanging drop</i> (tetes gantung) merupakan metode yang membentuk sel dengan menggunakan gaya gravitasi bumi yang akan membuat sel dapat beragregasi dengan bebas seperti pada jaringan <i>in vivo</i> .	Tetesan suspensi sel	Suspensi sel yang berada di permukaan platform diteteskan dan dibalikkan dengan mengandalkan gaya gravitasi.	Kategorik
---------------------	--	----------------------	--	-----------

**Tabel 3.2** Definisi Operasional

### 3.9 Biaya Penelitian

No.	Uraian	Biaya
1.	Reagensia	Rp. 1.500.000
2.	Analisis	Rp. 500.000
3.	<b>Total Biaya</b>	<b>Rp. 2.000.000</b>

**Tabel 3.3** Rincian Biaya Penelitian