

PEMBENTUKAN STRUKTUR SEL TIGA DIMENSI (3D) PADA SEL MCF-7 UNTUK PENGUJIAN SITOTOKSIK

THE FORMATION OF THREE DIMENSIONAL (3D) CELL CULTURE ON MCF-7 FOR CYTOTOXIC EVALUATION

¹⁾Anita Sukmawati, ¹⁾Ratna Yuliani, ¹⁾Wahyu Utami, ¹⁾Nur Aini

¹⁾Fakultas Farmasi

Universitas Muhammadiyah Surakarta

Jl. A. Yani, Tromol Pos 1, Pabelan, Surakarta

*Email: anita.sukmawati@ums.ac.id

ABSTRAK

Penggunaan struktur sel 2 dimensi (2D) untuk pengujian senyawa sitotoksik telah secara rutin dilakukan. Tetapi model 2D ini tidak dapat menyerupai kompleksitas sel *in vivo*, sehingga aktivitas antikanker yang dihasilkan mungkin akan berbeda. Kultur sel tiga dimensi (3D) memiliki bentuk yang menyerupai jaringan tumor *in vivo*, terutama adanya interaksi matriks ekstraseluler (extracellular matriks, ECM) pada sel sehingga diharapkan mampu meningkatkan sensitifitas pengujian sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pembentukan sel kultur 3D pada sel MCF-7 menggunakan metode forced-floating. Pembentukan struktur 3D dilakukan dengan melakukan variasi kecepatan sentrifugasi pada sel MCF-7. Variasi kecepatan yang digunakan adalah 0 (tanpa sentrifugasi), 800, 1000, 2000, 2700, 3900, 5500 dan 11000 rpm. Diameter sel aggregate yang terbentuk dievaluasi menggunakan mikroskop mulai hari ke-4. Pengukuran diameter aggregate dilakukan menggunakan software ImageJ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembentukan aggregate yang memenuhi syarat untuk pengujian aktivitas anti kanker pada kultur sel 3D didapatkan dengan kondisi tanpa sentrifugasi. Kondisi ini menghasilkan agregat sel MCF-7 dengan diameter $1017 \pm 17 \mu\text{m}$ dan stabil selama 10 hari.

Kata Kunci : forced-floating, MCF-7, sel kultur, tiga dimensi, sitotoksik

ABSTRACT

The use of 2-dimensional (2D) cell structures for testing cytotoxic compounds has been routinely carried out. However, the 2D model cannot resemble cell complexity in vivo, as the result, the anticancer activity may be different.. Three-dimensional (3D) cell culture has a shape that resembles in vivo tumor tissue, especially the presence of extracellular matrix (ECM) matrix interactions in cells so that it is expected to increase the sensitivity of cytotoxic testing. This study aims to evaluate the formation of 3D culture cells in MCF-7 cells using the forced-floating method. The 3D structure formation is done by varying the velocity of centrifugation in MCF-7 cells. Variations in speed used are 0 (without centrifugation), 800, 1000, 2000, 2700, 3900, 5500 and 11000 rpm. The diameter of the formed cell aggregate was evaluated using a microscope at day 4. The measurement of aggregate diameter was done using ImageJ software. The results showed that the formation of aggregate that fulfilled the requirements for 3D cytotoxic activity was obtained without centrifugation. This condition produces MCF-7 cell aggregates with a diameter of $1017 \pm 17 \mu\text{m}$ and is stable for 10 days.

Key Words: forced-floating, MCF-7, cell culture, three dimensional, cytotoxic

PENDAHULUAN

Kultur sel dalam penelitian biologi memegang peranan penting dalam penelitian yang terkait dengan sel, antara lain untuk memahami mekanisme molekuler, pembentukan jaringan, organ serta terkait status penyakit, misalnya kanker. Sebagian besar penelitian yang dilakukan menggunakan sel saat ini adalah menggunakan kultur sel dua dimensi (2D). Sel kultur 2D memiliki kekurangan antara lain adalah terbatasnya interaksi sel-sel dan sel dengan matriks ekstraseluler (*extracellular matrix*, ECM) (Achilli, Meyer, & Morgan, 2012; do Amaral, Rezende-Teixeira, Freitas, & Machado-Santelli,

2011). Kekurangan sel kultur 2D ini sebenarnya dapat diatasi menggunakan permodelan *in vivo* menggunakan hewan uji, tetapi permodelan pada hewan seringkali tidak dapat menggambarkan keadaan sebenarnya seperti pada manusia. Oleh karena itu, permodelan sel kultur tiga dimensi (3D) mulai dikembangkan untuk mengatasi kekurangan model *in vitro* menggunakan kultur sel 2D dan model *in vivo* menggunakan hewan uji (do Amaral *et al.*, 2011).

Prinsip kultur sel 3D adalah pembentukan *spheroid* atau *aggregate* pada sel yang memiliki karakteristik dan fungsi seperti kondisi *in vivo*. Pada pengujian antikanker menggunakan sistem sel kultur 2D atau monolayer menunjukkan bahwa sel kanker lebih rentan terhadap senyawa antikanker dibandingkan dengan tumor *in vivo*. Hal ini dikarenakan perbedaan ekspresi antigen, pH, gradien oksigen yang dapat menembus sel tumor, kecepatan penetrasi faktor pertumbuhan dan distribusi pertumbuhan sel dalam tumor. Pada sel yang berbentuk *spheroid*, kemampuan senyawa antikanker untuk menembus *spheroid* menjadi lebih terbatas karena terjadi keterbatasan vaskularisasi dalam sel *aggregate* (Ho, Yeap, Ho, Rahim, & Alitheen, 2012).

Beberapa metode dapat digunakan untuk pembentukan *spheroid* antara lain *hanging drop* (HD) *method* dan *forced-floating* (FF) *method* yang masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Pada metode HD, ukuran sel *aggregate* dapat terkontrol dengan baik seperti yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Imani *et al* (2012). Tetapi, metode HD memerlukan tenaga dan waktu yang lebih banyak untuk mempersiapkan *aggregate-aggreat* sel yang dilakukan secara manual. Selain itu, volume medium pertumbuhan sel yang kecil mengharuskan penggantian medium yang lebih sering, sehingga dapat mengganggu pertumbuhan sel *aggreat*. Pada penelitian ini, pembentukan *spheroid* dilakukan menggunakan metode FF dimana pembentukan *spheroid* dapat diperoleh dengan melakukan sentrifugasi. Metode ini menawarkan pembentukan *spheroid* yang lebih mudah dan banyak dibandingkan dengan *hanging-drop* (Breslin & O'Driscoll, 2013).

Pada metode FF, *plate* yang digunakan untuk kultur sel disalut terlebih dahulu untuk mencegah sel menempel pada permukaan *plate* sel kultur, sehingga sel akan melayang (*floating*) dan kontak antar sel untuk membentuk *spheroid* akan terjadi lebih mudah (Breslin & O'Driscoll, 2013). Untuk membantu interaksi antar sel, dilakukan sentrifugasi pada kultur sel. Kecepatan sentrifugasi ini akan mempengaruhi pembentukan dan kestabilan *spheroid* yang terbentuk. Beberapa kecepatan sentrifugasi yang pernah diterapkan pada penelitian sebelumnya antara lain 500 x g, 800 rpm, 1000 x g dan 2000 rpm (Achilli *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2012; Imani *et al.*, 2012; Loessner, Kobel, Clements, Lutolf, & Hutmacher, 2013). Untuk pengujian aktivitas antikanker, diperlukan *spheroid* yang berukuran relatif seragam dan memiliki kestabilan bentuk selama masa pengujian. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pembentukan *spheroid* yang optimal pada sel kanker MCF-7 yang selanjutnya akan digunakan untuk pengujian aktivitas antikanker.

METODE

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sentrifuge (K Tabletop Centrifuge PLC-03), *centrifuge tube* 15 mL (Iwaki), *culture microscope* CKX41 (Olympus), kamera mikroskop (Optilab), software ImageJ, mini spin plus eppendorf (Hamburg) dan *96-well flat bottom plate* (Iwaki). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel MCF-7 (dari pemberian Prof. M. Kawaichi, Nara Institute Science and Technology, Jepang), *Phospat Buffer Salin* (PBS) (Invitrogen), Trypsin-EDTA 0,25% b/v (Sigma) dan agarosa (Merck). Medium sel yang digunakan untuk pertumbuhan sel adalah *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Merck) dengan penambahan 10% Fetal Bovine Serum (Serana SA) dan Penicillin-Streptomycin (Sigma),.

Pembentukan Kultur Spheroid MCF-7

Spheroid MCF-7 dibuat dengan metode *forced-floating* yang diadopsi dari penelitian Ho *et al* (2012) dengan sedikit modifikasi. Untuk mencegah sel melekat pada dasar tabung, *96-well flat bottom plate* dilapisi dengan 50 µL agarosa 1,5% dan dibiarkan dingin dan mengeras selama 20 menit. Suspensi sel

(5×10^4 sel dalam 200 μ L medium sel kultur) dalam eppendorf diberi perlakuan tanpa sentrifugasi (0 rpm) dan dengan sentrifugasi (mini spin plus, Eppendorf) pada kecepatan 800, 1000, 2000, 2700, 3900, 5500 dan 11000 rpm selama 15 menit. Sel yang telah disentrifugasi lalu dipindahkan ke dalam 96-well flat bottom plate yang telah dilapisi dengan agarosa. Kultur sel diinkubasi dengan kondisi 5% CO₂ pada suhu 37° C dengan pergantian media setiap dua hari.

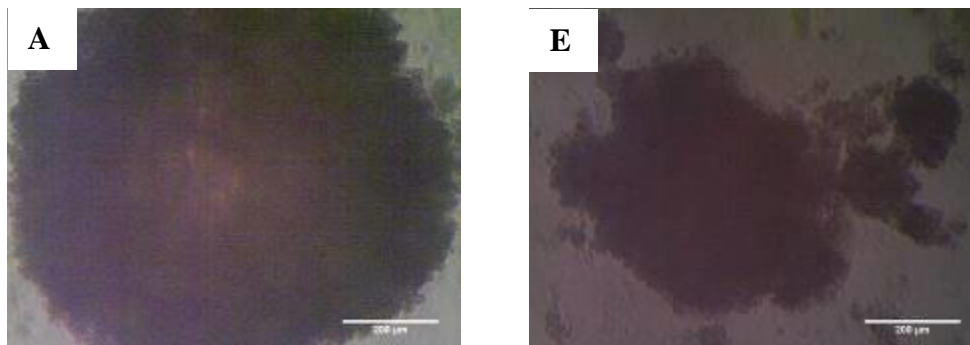
Evaluasi Pembentukan Sferoid

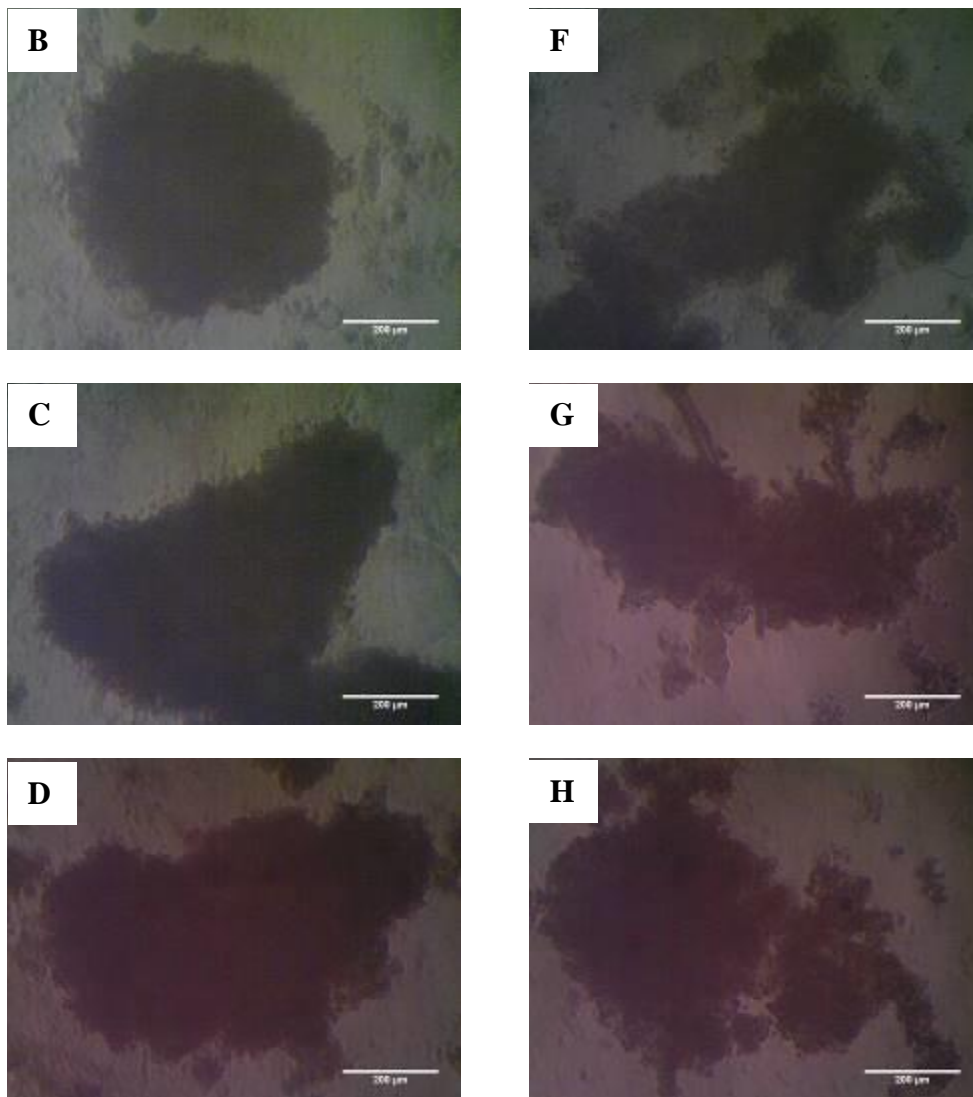
Evaluasi pembentukan sferoid dilakukan dengan mengukur diameter sferoid yang terbentuk dan mengamati stabilitas ukuran sferoid selama 10 hari. Pengamatan pembentukan sferoid dilakukan mulai hari ke-4 menggunakan mikroskop fase kontras (Olympus) dengan perbesaran 10 kali yang terhubung dengan kamera. Analisis diameter sferoid dilakukan menggunakan software ImageJ.

HASIL DAN PEMBAHASAN

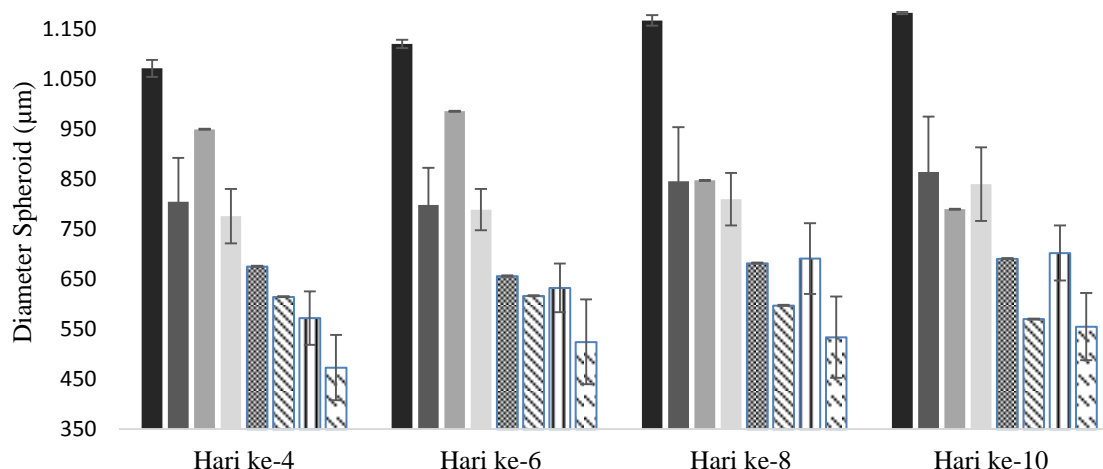
Pembentukan aggregate diamati pada hari keempat dari pembentukan sferoid. Pada hari keempat, telah terjadi pembentukan aggregate pada semua kondisi sel kultur dengan kondisi pre-kultur tanpa sentrifugasi dan dengan sentrifugasi pada kecepatan 800 rpm hingga 11000 rpm. Pembentukan agregat dapat dengan mudah terjadi karena adanya gaya gravitasi yang mendukung sel untuk dapat saling menempel satu sama lain untuk membentuk agregat seperti yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Breslin & O'Driscoll, 2013). Sentrifugasi diketahui dapat mempercepat pembentukan aggregate pada sel karena gaya sentrifugal yang dihasilkan mampu memediasi agregasi sel menjadi lebih kompak (Stadler *et al.*, 2018). Pada kondisi tanpa sentrifugasi, agregat berbentuk bulat sempurna. Seiring dengan peningkatan kecepatan sentrifugasi, bentuk bulat berubah menjadi tidak beraturan (**Gambar 1**). Bentuk agregat yang tidak beraturan dihasilkan pada sel kultur yang mengalami sentrifugasi dengan kecepatan lebih dari 800 rpm (**Gambar 1. C-G**).

Pengamatan terhadap bentuk dan diameter aggregate pada kultur sel MCF-7 dilanjutkan hingga hari ke-10 dengan pengamatan pada hari ke 6, 8 dan 10. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah hari ke-6, diameter agregat pada kultur sel yang disentrifugasi dengan kecepatan diatas 1000 rpm mengalami penurunan ukuran diameter (**Gambar 2**) dikarenakan sebagian sel menjadi berpisah dan tidak membentuk agregat yang utuh.





Gambar 1. Agregat MCF-7 yang terbentuk pada pengamatan hari ke-4 pada kondisi tanpa sentrifugasi (A), kecepatan sentrifugasi 800 rpm (B), 1000 rpm (C), 2000 rpm (D), 2700 rpm (E), 3900 rpm (F), 5500 rpm (G) dan 11000 rpm (H). Garis skala menunjukkan 200 μm .



Gambar 2. **Diameter aggregate pada hari ke hari ke-4, 6, 8, dan 10 (n = 3) pada kondisi tanpa sentrifugasi (■), sentrifugasi 800 RPM (■), 1.000 RPM (■), 2.000 RPM (■), 2.700 RPM (■), 3.900 RPM (■), 5.500 RPM (■); dan 11.000 RPM (■) selama 10 hari inkubasi. Bar menunjukkan standar deviasi (SD).**

Pengamatan terhadap stabilitas pertumbuhan agregat hingga hari ke-10 menunjukkan agregat menjadi kehilangan bentuknya pada kecepatan sentrifugasi diatas 1000 rpm. Hal ini menunjukkan bahwa peranan gaya gravitasi terhadap pembentukan agregat pada sel MCF-7 hanya berlangsung pada fase awal. Pembentukan agregat selanjutnya sangat bergantung pada interaksi antar sel dan mungkin dapat terganggu dengan adanya proses sentrifugasi.

Keseragaman bentuk agregat juga menjadi penting dalam pengujian senyawa antikanker menggunakan sel kultur 3D karena dapat mempengaruhi difusi zat aktif. Homogenitas agregat dapat dilihat dari harga standar deviasi (SD) antar agregat pada kondisi yang sama. **Gambar 2** menunjukkan bahwa standar deviasi yang kecil diperoleh dari pembentukan sel kultur 3D tanpa sentrifugasi, pada kecepatan 1000 rpm, 2700 rpm dan 3900 rpm. Tetapi pada kondisi pembentukan sel kultur 3D dengan ketiga kecepatan tersebut, agregat menjadi longgar dan mengalami pemisahan pada pengamatan hari ke-8 yang ditunjukkan dengan penurunan diameter agregat. Agregat yang berukuran relatif homogen didapatkan pada kondisi tanpa sentrifugasi. Selain itu, ukuran agregat pada kondisi ini mengalami peningkatan yang cukup bermakna dari hari ke- hingga ke 10 (*anova single factor*, $p < 0.05$). Untuk itu, kondisi pembentukan sel kultur 3D untuk MCF-7 yang dapat digunakan untuk pengujian antikanker adalah pada kondisi tanpa sentrifugasi.

Secara ideal, ukuran diameter sferoid yang diperlukan pada sistem kultur sel 3D adalah 250-500 µm (Imani *et al.*, 2012). Pada penelitian ini, agregat yang terbentuk pada tahap awal (hari ke-4) memiliki diameter di atas 450 µm dikarenakan jumlah sel awal yang digunakan untuk pembentukan agregat cukup besar yaitu 5×10^4 sel dalam tiap sumuran. Idealnya, jumlah sel untuk 1 sumuran pada 96-well plate adalah berkisar antara 5000-10000 sel. Untuk itu selanjutnya perlu dilakukan pengaturan jumlah sel yang digunakan dalam pembentukan agregat agar sesuai dengan ukuran yang diinginkan.

KESIMPULAN

Pembentukan sel kultur 3D pada sel MCF-7 dapat dilakukan menggunakan metode *forced-floating*. Agregat yang dihasilkan dengan kondisi tanpa sentrifugasi menunjukkan bentuk sferoid, memiliki ukuran yang homogen serta tetap mempertahankan bentuknya hingga hari ke-10.

DAFTAR PUSTAKA

- Achilli, T., Meyer, J., & Morgan, J. R. (2012). Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther*, 12(10), 1347–1360. <http://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>.Advances
- Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5–6), 240–249. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
- do Amaral, J. B., Rezende-Teixeira, P., Freitas, V. M., & Machado-Santelli, G. M. (2011). MCF-7 Cells as a Three-Dimensional Model for the Study of Human Breast Cancer. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(11), 1097–1107. <http://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0260>
- Ho, W. Y., Yeap, S. K., Ho, C. L., Rahim, R. A., & Alitheen, N. B. (2012). Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) Culture from Breast Cancer Cell and a High Throughput Screening Method Using the MTT Assay. *PLoS ONE*, 7(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044640>
- Imani, R., Hojjati Emami, S., Fakhrzadeh, H., Baheiraei, N., & Sharifi, A. M. (2012). Optimization and comparison of two different 3D culture methods to prepare cell aggregates as a bioink for organ printing. *Biocell*, 36(1), 37–45.
- Loessner, D., Kobel, S., Clements, J., Lutolf, M., & Huttmacher, D. (2013). Hydrogel Microwell Arrays Allow the Assessment of Protease-Associated Enhancement of Cancer Cell Aggregation and Survival. *Microarrays*, 2(3), 208–227. <http://doi.org/10.3390/microarrays2030208>
- Stadler, M., Scherzer, M., Walter, S., Holzner, S., Pudelko, K., Riedl, A., Dolznig, H. (2018). Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-19384-0>