



KODE ARTIKEL : PPK-25-5-5-1

Evaluasi Konsentrasi Human Platelet Lysate yang Optimum untuk Mendukung Viabilitas Sel-Sel Hati Mencit (*Mus musculus*) Selama Cryopreservation dan Kultur Post-Thawing

YASMIN AURA ISLAM, GRATIANA EKANINGSIH WIJAYANTI, DIANI MENTARI*

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

**email korespondensi* : diani.mentari@unsoed.ac.id

ABSTRAK

Kultur sel hewan merupakan suatu proses dimana sel-sel dari jaringan hewan ditempatkan dan ditumbuhkan dalam lingkungan yang sesuai di luar tubuhnya. Kultur sel memerlukan serum sebagai suplemen, serum yang sering digunakan adalah Fetal Bovine Serum (FBS). Namun, penggunaan FBS memiliki keterbatasan, termasuk biaya tinggi dan dampak negatif terhadap kesejahteraan hewan. Human Platelet Lysate (HPL) yang dihasilkan melalui proses freezing-thawing dari Platelet Concentrate (PC) berkualitas baik dapat dijadikan sebagai alternatif pengganti FBS. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi HPL yang optimum untuk mendukung viabilitas dan densitas pada cryopreservation sel hati mencit (*Mus musculus*) serta mengetahui konsentrasi HPL yang sesuai untuk mendukung viabilitas, densitas, dan morfologi pada kultur sel post-thawing hati mencit (*Mus musculus*). Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental dalam dua tahapan eksperimental berkelanjutan yaitu dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan (FBS 20%, HPL 25%, HPL 20%, HPL 15%, dan HPL 10%) dengan 5 ulangan pada proses cryopreservation dan 5 perlakuan (FBS 20%, HPL 25%, HPL 20%, HPL 15%, dan HPL 10%) dengan 3 ulangan pada kultur post-thawing cryopreservation selama 21 hari. Berdasarkan hasil penelitian, pada cryopreservation sel-sel hati mencit selama 21 hari, pemberian suplemen serum HPL 15% mampu mempertahankan viabilitas dan densitas sel-sel hati mencit, sedangkan HPL 25% mampu mempertahankan viabilitas dan densitas sel-sel hati mencit pada cryopreservation selama 28 hari. Sel-sel hati yang telah di-cryopreserved selama 21 hari dan telah dikultur dengan penambahan konsentrasi HPL 25% dalam medium memiliki morfologi bentuk sel poligonal dengan inti di tengahnya.

Kata kunci : Cryopreservation, hati mencit, Human Platelet Lysate, kultur sel, viabilitas.

PENDAHULUAN

Kultur sel hewan merupakan proses kompleks yang diawali dengan isolasi sel dari jaringan atau organ dari kondisi alami (*in vivo*) kemudian ditumbuhkan dalam kondisi buatan yang lingkungannya dikendalikan (*in vitro*). Pada kondisi *in vitro*, sel-sel dipelihara dalam media kultur dan disuplementasi dengan serum. Serum yang paling sering digunakan adalah Fetal Bovine Serum (FBS) yang diperoleh dari darah fetus sapi yang dikoleksi secara aseptik. FBS digunakan untuk merangsang pertumbuhan sel karena mengandung growth factor. Penggunaan FBS sebagai suplemen dalam medium kultur *in vitro* dinilai memiliki beberapa kekurangan, antara lain harganya mahal dan dalam proses mendapatkannya induk sapi yang sedang hamil harus dikorbankan (*eutanasia*) sehingga menimbulkan keberatan pada pihak-pihak tertentu (Mentari et al., 2020). Oleh karena itu perlu dicari alternatif serum dalam pelaksanaan kultur sel.

Salah satu bahan yang dapat digunakan sebagai alternatif pengganti FBS adalah Human Platelet Lysate (HPL). HPL merupakan komponen darah yang dibuat dari proses freezing-thawing yang dilakukan secara berulang dengan maksud untuk melisis trombositis dan membuang sisa-sisa trombositis untuk mendapatkan faktor pertumbuhan. HPL memiliki beberapa keuntungan seperti efektivitas, biaya terjangkau dan memungkinkan diproduksi dalam skala besar dan terstandarisasi. HPL mampu meningkatkan proliferasi sehingga memungkinkan produksi terapeutik sel yang aman dan dalam jangka waktu yang sesuai (Oeller et al., 2021).



Selain digunakan dalam kultur, serum juga merupakan komponen penting dalam medium yang digunakan untuk cryopreservation sel. Penambahan serum dan cryopreservation medium bertujuan untuk melindungi sel dari cold shock, baik dalam proses freezing maupun pada saat thawing (Utami et al., 2019). Teknik cryopreservation merupakan suatu teknik penyimpanan sel hewan, ataupun materi genetika lain (termasuk semen) dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel di dalam sel sehingga fungsi fisiologis, biologis, dan morfologis tetap ada. Kemampuan HPL sebagai suplemen kultur sel telah diuji dapat mendukung proliferasi pada cell line khususnya MCF-7 (Fazzina, 2016) dan pada stem cells (Palombella, 2022), namun penggunaannya sebagai suplemen dalam cryopreservation belum pernah diteliti, oleh karena itu dalam penelitian ini akan diuji berbagai konsentrasi HPL dalam medium cryopreservation sel-sel hati mencit (*Mus musculus*).

MATERI DAN METODE

A. Seleksi komponen PC

Berdasarkan PERMENKES No. 91 Tahun 2015, kriteria PC yang dibutuhkan yaitu berwarna kuning jernih, masih terdapat swirling (indikator PC yang baik dan mengandung fibrin), memiliki pH >6,4, dan terbebas dari kontaminasi bakteri. PC berasal dari pendonor laki-laki yang berumur <35 tahun, karena laki-laki memiliki hormon yang lebih stabil dan pada usia tersebut sehingga pendonor dalam kondisi prima. PC berasal dari pendonor golongan darah O, karena golongan darah O memiliki stok yang relatif lebih banyak dibandingkan dengan golongan darah lainnya.

B. Pembuatan HPL

Proses pembuatan HPL dilakukan dengan metode freezing-thawing. PC melalui proses pooling, selanjutnya dilakukan proses freezing PC pada freeze gliserol dan dilanjutkan dengan proses thawing. PC dimasukkan ke dalam deep freezer -40°C selama kurang lebih tiga jam, kemudian PC dicairkan pada waterbath selama kurang lebih 30 menit dengan temperature 37°C. Proses freezing-thawing dilakukan sebanyak empat kali. Selanjutnya PC disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu ruang. Supernatan selanjutnya difilter menggunakan Millipore vacuum filter ukuran 0,22 µm, proses ini harus dilakukan secara aseptik dalam BSC. Supernatan yang telah selesai difilter dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge 15 mL pada kondisi steril dan disimpan di freezer -20°C hingga digunakan.

C. Persiapan dan Pembuatan Cryomedium

Sebelum melakukan proses kultur, perlu dilakukan preparasi medium kultur. Pembuatan medium kultur untuk tahap cryopreservation (cryomedium) dilakukan secara aseptik di atas ice pack. Proses pembuatan cryomedium yaitu dengan mencampur DMEM dengan tambahan suplemen serum 20% FBS, 5% Antibiotik (Penicillin/Streptomycin), 0,5% fungizone, dan 10% DMSO. Komponen cryomedium lainnya yaitu HPL (25%, 20%, 15%, 10%), 5% Antibiotik (Penicillin/Streptomycin), 0,5% fungizone, dan 10% DMSO pada botol (cryotube) lalu dihomogenkan. Pembuatan cryomedium harus dilakukan di atas ice pack dan telah siap diekuilibrasikan pada temperatur dingin. Pembuatan medium kultur sel post-thawing dilakukan secara aseptik dalam LAF dengan mencampurkan DMEM, 20% serum (FBS/HPL), 5% Antibiotik (Penicillin/Streptomycin), dan 0,5% fungizone pada microtube 1,5 mL lalu dihomogenkan. Pemberian konsentrasi DMEM ditentukan dengan jumlah kepadatan sel yang akan dikultur.

D. Pengambilan Organ dan Disosiasi Sel Hewan Uji

Mencit dikorbankan dengan cara cervical dislocation (dislokasi leher), pada tahap ini harus dilakukan dengan cepat, jangan sampai menyiksa hewan uji. Mencit diposisikan pada papan bedah, kemudian mencit dibedah dari bagian posterior ke bagian anterior menggunakan gunting bedah. Organ hati mencit diangkat dan diletakkan dalam petri dish steril yang telah diisi dengan handling medium. Organ hati dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil selanjutnya didisosiasi. Disosiasi merupakan proses penghancuran organ menggunakan frosted glass sampai terpisah dengan jaringan ikat. Pada saat proses disosiasi, bunsen harus



dalam keadaan menyala. Jaringan yang telah terpisah dengan jaringan ikat difilter menggunakan syringe dengan ukuran jarum 18G, 23G, 27G masing-masing sebanyak tiga kali. Sel hati yang telah melalui proses disosiasi dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 15 mL secara aseptik. Selanjutnya, tabung disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, lalu supernatant dibuang. Pellet sel diresuspensi dengan medium yang telah mengandung 10% serum. Pemberian serum sesuai dengan jenis perlakuan yang digunakan (FBS dan HPL), lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi, pellet sel diresuspensi dengan medium resuspensi.

E. Perhitungan Viabilitas dan Densitas Sebelum Cryopreservation

Sel hasil disosiasi yang telah berada dalam medium resuspensi diambil sebanyak 50 µl dan dimasukkan ke dalam microtube 1,5 mL dan ditambahkan dengan trypan blue sebanyak 50 µl, kemudian dihitung kepadatan dan viabilitasnya dengan bantuan haemocytometer dan mikroskop cahaya.

$$\text{Viabilitas} = (\text{Jumlah sel hidup}) / (\text{Jumlah sel hidup} + \text{sel mati}) \times 100\%$$

$$\text{Densitas} = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \sum \text{sel} \cdot 2$$

F. Penyimpanan Sel Hati Mencit dengan Teknik Cryopreservation

Sel hati mencit disiapkan beserta alat dan cryomedium. Cryomedium dengan volume 900 µl dimasukkan ke dalam cryotube, dilanjutkan dengan menambahkan suspensi sel sebesar 100µl sehingga kepadatan akhir adalah 107.. Proses tersebut harus dilakukan diatas ice pack dan di dalam LAF. Cryotube di-seal menggunakan parafilm dan diberi label pada badan cryotube. Cryopreservation pada penelitian ini menggunakan metode slow freezing, metode ini bertujuan untuk menghindari risiko kerusakan sel akibat pembekuan dengan suhu yang tinggi. Cryotube dimasukkan ke dalam mr. frosty, selanjutnya mr.frosty disimpan dalam freezer -20°C selama dua jam, dilanjutkan dengan penyimpanan pada freezer -80°C selama tiga minggu. Temperatur freezer dicatat setiap hari (Li et al., 2010).

G. Thawing (Pencairan Kembali)

Thawing merupakan tahap pencairan kembali setelah dilakukan penyimpanan sel menggunakan teknik cryopreservation (Engelmann et al., 1985). Thawing dilakukan dengan menggunakan waterbath pada temperatur 37°C. Proses thawing harus dilakukan dengan cepat karena DMSO dapat memberikan efek negatif terhadap sel pada temperatur ruang. Proses thawing yang lambat akan menyebabkan DMSO bersifat toksik pada sel-sel tersebut. Sel yang telah di-thawing disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk mengambil cryomedium. Pelet diresuspensi dalam 1 mL washing medium dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, proses ini diulang 3 kali untuk memastikan bahwa semua cryoprotectant telah tercuci. Sel yang telah diberi washing medium FBS (DMEM 75%; FBS 20%, Antibiotik 5% dan fungizone 0,5%), dan washing medium HPL (DMEM 75%; HPL 20%, Antibiotik 5% dan fungizone 0,5%), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, setelah disentrifugasi kemudian washing medium dibuang dan diganti dengan resuspensi medium, lalu dihomogenkan. Selanjutnya dihitung viabilitas dan densitasnya.

H. Kultur Sel Hati Mencit Post-Thawing

Kultur sel post-thawing diambil dari ulangan 1 sampai 3 hasil post-thawing cryopreservation penyimpanan 21 hari yang terdiri dari konsentrasi HPL (25%, 20%, 15%, 10%) dan kontrol FBS. Estimasi persentase viabilitas yang diambil yaitu 70-80%. Persiapan kultur sel dilakukan dalam LAF dengan kondisi aseptik. Medium kultur yang dibutuhkan yaitu DMEM high-glucose (yang telah mengandung L-glutamin), 20% serum, 5% antibiotik (penicillin/streptomycin), dan 0,5% fungizone. Medium kultur dimasukkan ke dalam microtube 1,5 mL dan ditambah dengan sel yang didapat dari hasil perhitungan kemudian dihomogenkan menggunakan micropipette. Medium yang telah mengandung sel tersebut di-platting ke dalam well pada 96 well plate sehingga kepadatan per well adalah 104. Sel yang telah di-platting pada well plate 96 selanjutnya diinkubasi pada inkubator CO2 dengan kadar CO2 5% dan temperatur 37°C selama tiga hari. Kultur sel ini dilakukan



untuk mengetahui konsentrasi HPL dari hasil cryopreservation yang optimum dalam mempertahankan viabilitas dan densitas pada kultur sel post-thawing, serta untuk mengetahui morfologi sel hati mencit.

I. Monitoring dan Evaluasi Hasil Kultur

Kultur sel hati mencit yang disimpan di dalam inkubator CO₂ dengan temperatur 37°C diamati selama tiga hari. Monitoring mencakup temperatur, kelembaban, dan warna medium. Kultur sel yang baik memiliki warna medium merah muda, perubahan warna menjadi kuning atau oranye menunjukkan bahwa telah terjadi kontaminasi. Pemanenan dilakukan dengan mengambil medium menggunakan micropipette dan ditampung pada tabung sentrifuge 15 mL. Well plate dibilas menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali dan ditampung pada wadah yang telah tersedia. Selanjutnya penambahan trypsin pada well dan diinkubasi dalam incubator CO₂ selama 5 menit, dilanjutkan dengan pengamatan sel pada mikroskop. Medium yang berisi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan ditambah dengan washing medium dan diresuspensi kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk menginaktivasi trypsin, langkah ini dilakukan sebanyak tiga kali. Evaluasi hasil kultur dilakukan pada hari keempat dengan mengamati morfologi menggunakan inverted microscope, perhitungan densitas menggunakan haemocytometer, serta viabilitas menggunakan Kit CCK-8 dan dibaca menggunakan ELISA reader. Pengamatan morfologi sel dilakukan setiap hari untuk mengetahui perkembangan sel.

$$\text{Viabilitas} = (\text{Abs perlakuan} - \text{Abs medium}) / (\text{Abs kontrol} - \text{Abs medium}) \times 100\%$$

$$\text{Perolehan sel} = \text{Viabilitas} \times \text{Densitas} \times 10^4$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan preparasi sel hati mencit sebelum dilanjutkan ke tahap penyimpanan beku (cryopreservation). Pada proses preparasi didapatkan viabilitas awal sel hati mencit sebesar 94% untuk suplemen serum HPL, dan sebesar 86% untuk suplemen serum FBS dengan kepadatan awal yaitu 1 x 10⁷ sel/mL. Viabilitas yang berbeda pada serum HPL dan FBS disebabkan pemberian resuspensi medium yang disesuaikan dengan perlakuan penelitian. Hal tersebut bertujuan agar sel-sel hati mencit mudah beradaptasi dengan suplemen serum pada saat cryopreservation maupun pada saat kultur post-thawing cryopreservation. Sel-sel hati mencit diharapkan dapat memiliki viabilitas dan densitas yang tinggi jika dapat menyesuaikan dengan komposisi medium yang telah ditentukan.

A. Uji Viabilitas dan Densitas Post-Thawing Cryopreservation

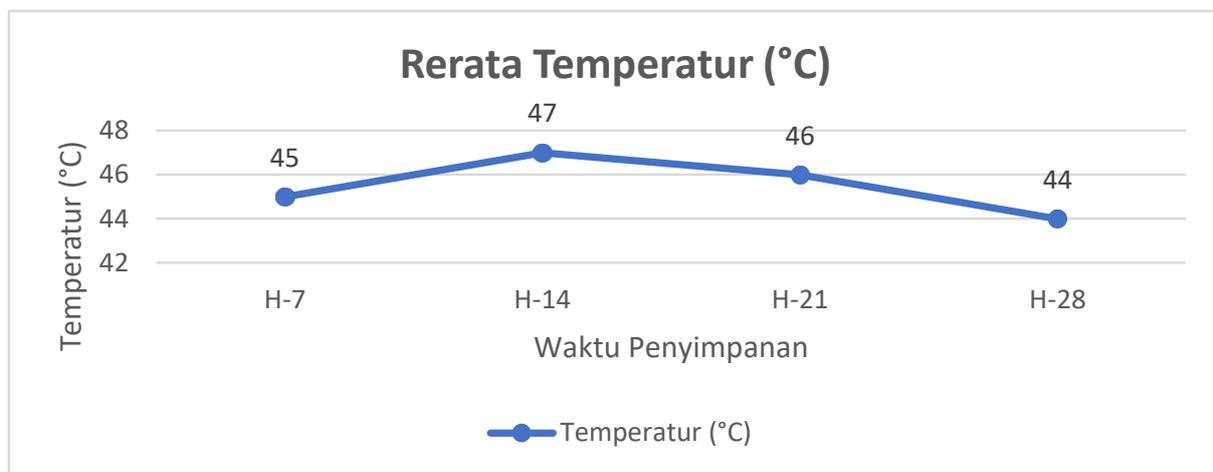
Viabilitas sel hati mencit yang disimpan selama 21 hari berkisar antara 70,00±0,05% hingga 80,67±0,04%. Viabilitas sel hati mencit yang disimpan selama 28 hari berkisar antara 41,50±0,12% hingga 61,00±0,04%. Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa viabilitas sel hati mencit yang disimpan dengan konsentrasi serum yang dianalisis secara statistik tidak berbeda signifikan (P>0,05) (Tabel 1). Hasil tersebut menyatakan bahwa pemberian berbagai konsentrasi serum dalam cryomedium dengan kondisi sel-sel hati mencit yang di-cryopreserved selama 21 hari maupun pemberian berbagai konsentrasi serum dengan kondisi sel-sel hati mencit yang di-cryopreserved selama 28 hari menghasilkan viabilitas sel yang berada dalam kelompok yang sama.

Tabel 1. Rerata viabilitas sel-sel hati mencit post-thawing dengan perbedaan konsentrasi serum pada metode cryopreservation selama 21 dan 28 hari.

Perlakuan	H-21 (n=3)	H-28 (n=2)
	Rerata±SD	Rerata±SD
FBS 20%	78,67±0,03a	48,50±0,02a
HPL 25%	80,67±0,04a	61,00±0,04a
HPL 20%	78,33±0,03a	54,00±0,05a
HPL 15%	79,00±0,03a	45,00±0,01a
HPL 10%	70,00±0,05a	41,50±0,12a

Keterangan : a,b,c = notasi berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata.

Meskipun hasil analisis ANOVA menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan, namun terdapat kecenderungan bahwa semakin rendah konsentrasi HPL dalam cryomedium semakin rendah pula viabilitas sel. Oleh karena itu dilakukan uji tambahan berupa analisis korelasi. Hasil analisis korelasi menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang cukup kuat antara viabilitas sel dengan konsentrasi HPL dalam cryomedium pada penyimpanan selama 21 hari dengan nilai $r = 0,656$. Korelasi antar viabilitas dan konsentrasi HPL dalam cryomedium semakin kuat pada penyimpanan selama 28 hari yang ditunjukkan dengan nilai $r = 0,828$. Penurunan viabilitas pada penyimpanan H-28 terjadi karena waktu penyimpanan yang lebih lama, hal tersebut sesuai dengan penelitian Maulida et al. (2020), yang menyatakan bahwa waktu penyimpanan sel dapat mempengaruhi viabilitas sel tersebut dikarenakan sel yang disimpan dalam suhu yang sangat rendah akan menghentikan proses metabolisme sel serta dapat menyebabkan kerusakan pada struktur dan fungsi sel karena terjadi pembentukan kristal es pada sel tersebut.



Gambar 1. Rerata temperatur refrigerator pada *cryopreservation* sel-sel hati mencit selama 28 hari

Viabilitas yang cenderung menurun disebabkan oleh temperatur refrigerator yang tidak stabil pada saat penyimpanan. Berdasarkan data rerata temperatur yang telah diamati selama 28 hari menunjukkan adanya fluktuasi pada temperatur refrigerator yang berkisar antara -40°C hingga -50°C . Hal ini dapat menyebabkan kerusakan pada integritas membran sel, kenaikan dan penurunan suhu yang tidak teratur akan mengganggu permeabilitas membran sel, menghambat fungsi sel, dan akan menyebabkan kematian sel. Pembentukan kristal es pada *cryopreservation* juga dapat menyebabkan penumpukan elektrolit. Penumpukan elektrolit dapat merusak dinding sel pada saat proses thawing, selain itu elektrolit yang menumpuk akan menyebabkan ketidakseimbangan osmotik yang akan merusak sel dan menurunkan viabilitas sel (Gazali & Tambing, 2002). Protein membran sel juga dapat mengalami denaturasi akibat penyimpanan sel pada suhu yang ekstrem, sehingga dapat mengganggu fungsi protein dan mempengaruhi viabilitas sel. Selain itu, sel dapat mengalami dehidrasi dan terjadi perubahan struktur internal sel yang pada akhirnya akan menyebabkan kematian pada sel (nekrosis) (Masson & Lushchekina., 2022).

Densitas sel hati mencit yang disimpan selama 21 hari berkisar antara $12 \times 10^5 \pm 4,62$ sel/mL hingga $15,3 \times 10^5 \pm 3,21$ sel/mL. Densitas sel hati mencit yang disimpan selama 28 hari berkisar antara $9 \times 10^5 \pm 2,82$ sel/mL hingga $12 \times 10^5 \pm 2,82$ sel/mL. Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa densitas sel hati mencit yang disimpan dengan konsentrasi serum yang dianalisis secara statistik tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) (Tabel 2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian berbagai konsentrasi serum dalam cryomedium dengan kondisi sel-sel hati mencit yang di-cryopreserved selama 21 hari maupun pemberian berbagai konsentrasi

serum dengan kondisi sel-sel hati mencit yang di-cryopreserved selama 28 hari menghasilkan densitas sel yang berada dalam kelompok yang sama.

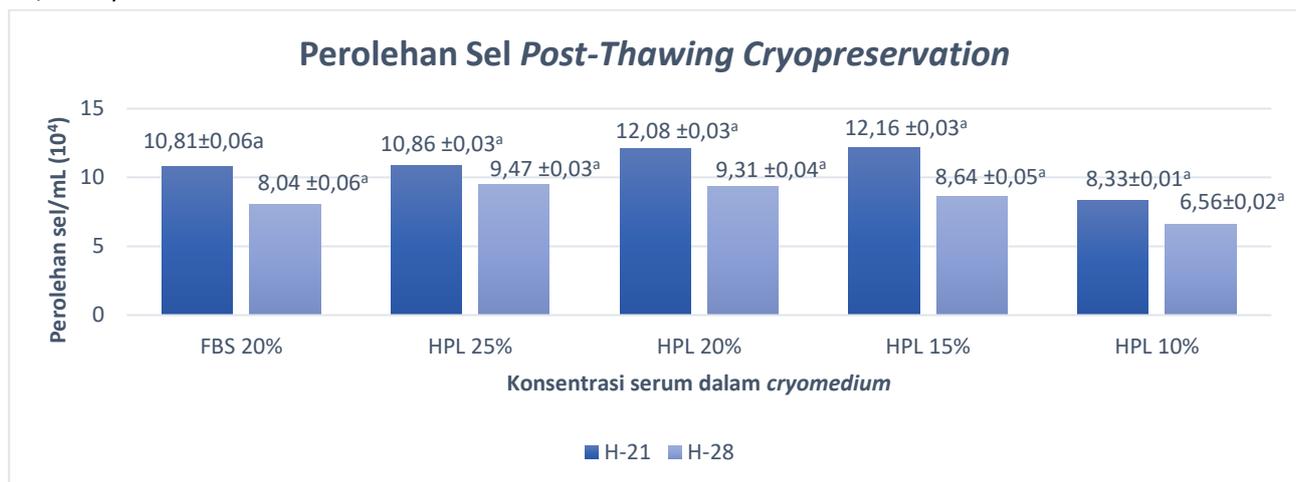
Tabel 2. Rerata densitas sel-sel hati mencit post-thawing dengan perbedaan konsentrasi serum pada metode cryopreservation selama 21 dan 28 hari.

Perlakuan	H-21 (n=3)	H-28 (n=2)
	Rerata±SD	Rerata±SD
FBS 20%	14 x 105±9,53a	8 x 105±0,00a
HPL 25%	13,3 x 105±3,51a	12 x 105±2,82a
HPL 20%	15,3 x 105±3,21a	9,5 x 105±7,07a
HPL 15%	15,3 x 105±4,16a	9 x 105±7,07a
HPL 10%	12 x 105±2,64a	9 x 105±2,82a

Keterangan : a,b,c = notasi berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata.

Berdasarkan hasil analisis ANOVA, rerata densitas pada sel-sel hati mencit yang disimpan beku cenderung menurun dari penyimpanan selama 21 hari ke 28 hari, namun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan satu sama lain (Tabel 4.2). Hasil analisis korelasi menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang cukup lemah antara densitas sel-sel hati mencit dengan konsentrasi HPL dalam cryomedium pada penyimpanan selama 21 hari yang ditunjukkan dengan nilai $r = 0,142$. Korelasi antar densitas dan konsentrasi HPL dalam cryomedium tergolong cukup kuat pada penyimpanan selama 28 hari yang ditunjukkan dengan nilai $r = 0,564$. Densitas sel-sel hati mencit pada penyimpanan selama 28 hari menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi HPL dalam cryomedium semakin rendah pula densitas sel.. Perubahan nilai densitas disebabkan karena terjadi penurunan aktivitas metabolik sel selama cryopreservation, dan dapat menurunkan densitas sel pada saat thawing (Bahoun et al., 2020).

Salah satu pemicu terjadinya penurunan densitas sel-sel hati mencit post-cryopreservation disebabkan oleh cold-shock yang menyebabkan berkurangnya aktivitas metabolisme pada sel, meskipun telah diberi pemberian cryoprotectant berupa DMSO yang cukup tinggi. Penggunaan cryoprotectant dengan dosis tinggi dapat meminimalisir pembentukan kristal es, namun dapat menimbulkan efek toksik bagi sel. Efek toksik dari cryoprotectant DMSO dapat menyebabkan sel mengalami nekrosis (kematian sel), namun DMSO yang dengan konsentrasi yang terlalu rendah tidak dapat mencegah kerusakan akibat penyimpanan beku (Aye et al., 2010).



Gambar 2. Jumlah perolehan sel-sel hati mencit hasil *Post-Thawing Cryopreservation* yang telah disimpan beku selama 21 dan 28 hari.

Berdasarkan hasil perolehan sel-sel hati mencit post-thawing cryopreservation yang dianalisis ANOVA menunjukkan bahwa perolehan sel hati mencit yang di-cryopreserved selama 21 hari dan 28 hari secara statistik menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$), sel hati mencit yang di-cryopreserved selama 21 hari memiliki nilai perolehan sel yang cukup tinggi dan terjadi penurunan pada



perolehan sel-sel hati mencit yang di-cryopreserved selama 28 hari. Pada sel-sel hati mencit yang di-cryopreserved selama 21 hari menunjukkan bahwa konsentrasi HPL yang optimum jika digunakan pada proses cryopreservation adalah HPL 15%, sedangkan konsentrasi HPL yang optimum digunakan dalam proses cryopreservation selama 28 hari adalah HPL 25%. Semakin lama jangka waktu penyimpanan sel-sel hati mencit, maka dibutuhkan suplemen serum HPL dengan konsentrasi yang lebih tinggi untuk dapat mempertahankan viabilitas dan densitas sehingga dihasilkan perolehan sel yang tinggi. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Devitt et al. (2015), menyatakan bahwa penyimpanan beku (cryopreservation) dengan jangka waktu yang lebih panjang secara signifikan dapat mengakibatkan terjadinya penurunan viabilitas sel. Oleh karena itu dilakukan penambahan suplemen serum HPL dan FBS dalam cryomedium dengan konsentrasi yang cukup tinggi dengan tujuan dapat mempertahankan viabilitas dan densitas sel.

B. Uji Viabilitas, Densitas, dan Pengamatan Morfologi Sel-Sel Hati Mencit yang telah di-cryopreserved dan Kultur Post-Thawing

Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa viabilitas dan densitas sel-sel hati mencit yang dikultur dari hasil post-thawing cryopreservation yang dianalisis secara statistik menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) (Tabel 3).

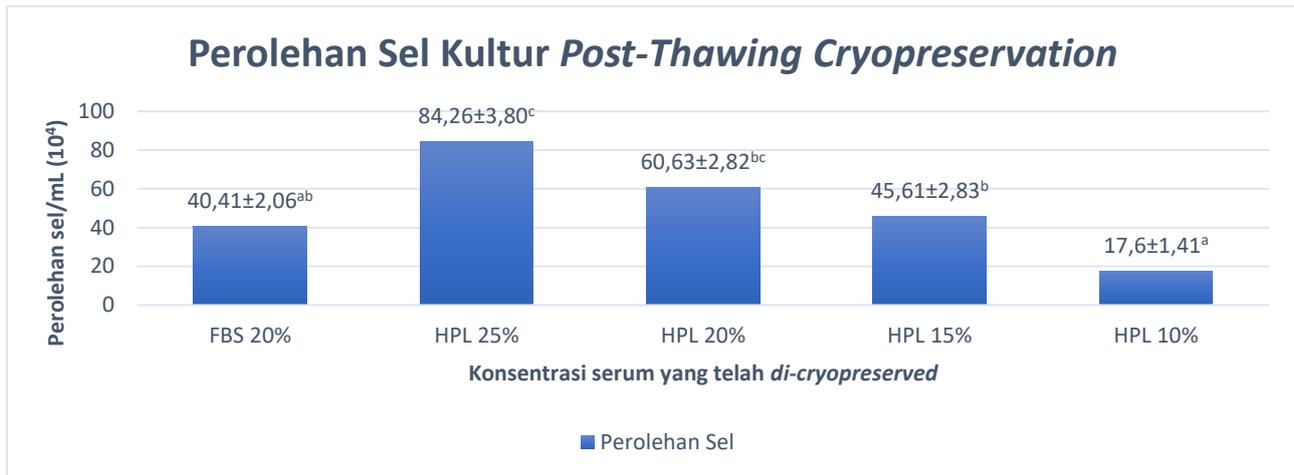
Tabel 3. Rerata persentase viabilitas dan jumlah densitas sel-sel hati mencit kultur post-thawing cryopreservation yang telah disimpan beku selama 21 hari dan dilakukan pembacaan melalui Elisa-reader.

Perlakuan	Viabilitas Kultur	Densitas Kultur
	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD
FBS 20%	68,89 \pm 0,14b	0,5 x 106 \pm 2,3a
HPL 25%	69,67 \pm 0,13b	1,1 x 106 \pm 4,0c
HPL 20%	59,33 \pm 0,14b	1 x 106 \pm 3,9bc
HPL 15%	61,00 \pm 0,21b	0,7 x 106 \pm 3,0ab
HPL 10%	39,00 \pm 0,19a	0,4 x 106 \pm 2,3a

Keterangan : a,b,c = notasi berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata.

Berdasarkan hasil rerata viabilitas sel kultur post-thawing cryopreservation menunjukkan bahwa perlakuan penambahan suplemen serum FBS dan HPL untuk kelompok perlakuan FBS 20%, HPL 25%, HPL 20% dan HPL 15% memiliki nilai rata-rata persentase viabilitas yang tidak berbeda signifikan dan lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan HPL 10%. Hal tersebut dikarenakan sel hati mencit hasil post-thawing cryopreservation yang disimpan beku selama 21 hari dengan penambahan suplemen serum HPL 10% memiliki nilai paling rendah dan kurang cocok jika dilanjutkan ke tahap kultur sel. Persentase viabilitas hasil kultur sel post-thawing cryopreservation pada perlakuan penambahan serum HPL 25% memiliki nilai yang paling tinggi dan hampir mencapai 70%. Menurut Uhrig et al. (2022), persentase viabilitas minimum dalam kultur sel setelah melewati proses thawing cryopreservation adalah 70%, standar tersebut dianggap layak dan dapat terus digunakan secara efektif pada berbagai aplikasi biomedis.

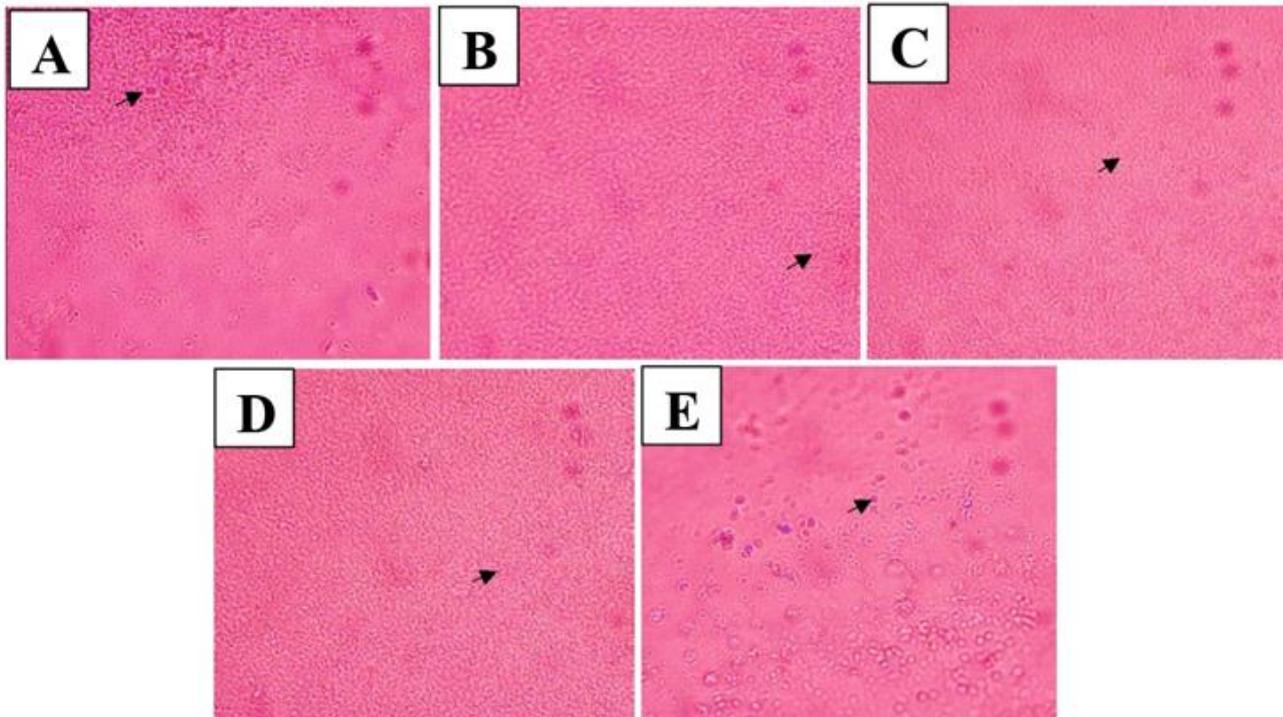
Hasil rerata densitas sel-sel hati mencit pada kultur post-thawing cryopreservation menunjukkan bahwa perlakuan penambahan suplemen serum FBS 20% memiliki nilai densitas yang tidak berbeda signifikan dengan HPL 10%. Pada perlakuan penambahan suplemen serum HPL 25% memiliki nilai densitas tertinggi dan secara signifikan berbeda dengan perlakuan kelompok lainnya. Pada perlakuan penambahan suplemen serum HPL 20% memiliki nilai densitas yang tidak berbeda signifikan dari kelompok perlakuan HPL 25%, sedangkan perlakuan penambahan serum HPL 15% memiliki nilai densitas yang tidak berbeda signifikan dari kelompok perlakuan HPL 10% (Tabel 4.3). Bahsoun et al. (2020), menyatakan bahwa standart minimum densitas dalam kultur sel setelah melewati proses thawing cryopreservation adalah 1 x 106 sel/mL. Perlakuan HPL 25% dan HPL 20% menunjukkan jumlah densitas yang dapat memenuhi nilai minimum densitas kultur post-thawing cryopreservation.



Gambar 3. Bagan jumlah perolehan sel hati mencit kultur *post-thawing cryopreservation*

Berdasarkan jumlah perolehan sel hati mencit setelah dilakukan kultur *post-thawing cryopreservation* (Gambar 4.4), didapatkan jumlah masing-masing nilai perolehan sel terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Nilai perolehan sel cenderung mengalami penurunan pada tiap perlakuan pemberian jenis dan konsentrasi serum. Pemberian suplemen serum HPL 25% menghasilkan nilai rata-rata jumlah perolehan sel yang cukup tinggi yakni $84,26 \times 10^4$ sel/mL, sedangkan pemberian suplemen serum HPL 10% menghasilkan nilai rata-rata jumlah perolehan sel yang paling rendah yakni $17,6 \times 10^4$ sel/mL. Perlakuan suplemen serum HPL yang memiliki konsentrasi tinggi dapat mendukung ketersediaan nutrisi yang dapat menyokong kebutuhan kultur sel (Burnouf et al., 2016).

Perolehan sel dari kultur *post-thawing cryopreservation* menunjukkan bahwa suplemen serum HPL memiliki rata-rata yang cukup tinggi. Hasil tersebut sejalan dengan pernyataan Guiotto et al., (2020) yang menyatakan bahwa suplemen serum HPL merupakan pilihan yang tepat untuk alternatif pengganti FBS pada proses kultur sel karena terdiri dari albumin, folat, vitamin B12, glukosa, trigliserida, dan kolesterol. HPL memiliki kandungan imunoglobulin (khususnya IgG) yang konsentrasinya lebih tinggi dibandingkan FBS, serta protein yang ikut berkontribusi dalam menjaga tekanan koloid media. Growth factor yang dimiliki oleh HPL seperti TGF- β , PDGF-A, PDGF-AA, PDGF-BB (growth factor yang diturunkan dari trombosit), dan HGF yang berfungsi untuk mendukung proliferasi sel, sehingga suplemen serum HPL dapat secara maksimal meningkatkan perolehan sel kultur *post-thawing cryopreservation*.



Gambar 4. Morfologi Sel Hati Mencit yang diinkubasi selama 3 hari dengan perlakuan penambahan suplemen serum yang telah di-cryopreserved dan ditambahkan konsentrasi serum 20% : A. FBS20%, B. HPL 25%, C. HPL 20%, D. HPL 15%, E. HPL 10%. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400x menggunakan *microscope inverted*.

Berdasarkan hasil pengamatan, sel-sel hati mencit yang diinkubasi selama 3 hari pada setiap perlakuan yang telah ditambahkan suplemen serum HPL dan FBS dengan konsentrasi 20% menunjukkan sel-sel hati mencit yang tersusun rapat. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Tuschl & Mueller (2006), menyatakan bahwa sel-sel hati mencit yang diberi tambahan suplemen serum akan meningkatkan perlekatan antar sel. Pada hasil kultur perlakuan penambahan suplemen serum HPL 25%, HPL 20%, dan HPL 15% yang telah di-cryopreserved menunjukkan sel-sel hati mencit mencapai >95% confluency (Gambar A,B,C), pada kondisi konfluen 100% sel cenderung rapat sehingga morfologi terlihat lebih kecil dibandingkan HPL 10%. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Caneparo et al. (2022) bahwa penambahan konsentrasi serum yang tinggi pada kultur sel akan meningkatkan persentase confluency. Sementara itu penambahan konsentrasi serum yang rendah akan mempengaruhi optimalisasi pertumbuhan sel. Seperti pada hasil kultur perlakuan penambahan suplemen serum HPL 10% dan FBS 20% yang telah di-cryopreserved menunjukkan sel-sel hati mencit mencapai 70% - 80% confluency.

Sel-sel hati mencit yang telah diinkubasi selama 3 hari memiliki karakteristik morfologi sel yang sama yakni berbentuk poligonal dan terdapat nukleus ditengah sel. Karakteristik morfologi tersebut serupa dengan karakteristik sel-sel hepatosit yang menyusun parenkim hati. Berdasarkan penelitian dari Godoy et al., (2013), menyatakan bahwa sel hepatosit yang memiliki bentuk poligonal dan terdapat nukleus di tengahnya merupakan sel yang sehat dan dapat berfungsi dengan baik. Nukleus yang terletak di tengah sel hepatosit menandakan bahwa sel-sel tersebut dalam kondisi aktif dalam menjaga kondisi internal sel dan memastikan sel dalam kondisi optimal selama proses inkubasi (Kietzmann, 2017).

SIMPULAN

1. Berdasarkan viabilitas dan densitas sel hasil post-thawing cryopreservation, diketahui bahwa konsentrasi HPL yang mampu mempertahankan viabilitas sel hingga 3 minggu cryopreservation adalah HPL 15% dan untuk 4 minggu adalah HPL 25%.



2. Berdasarkan perolehan hasil kultur sel hati mencit post-cryopreservation selama 21 hari diketahui bahwa konsentrasi HPL yang mampu mendukung pertumbuhan sel dan mempertahankan morfologi sel adalah HPL 25%.

DAFTAR PUSTAKA

- Aye, M., Di Giorgio, C., De Mo, M., Botta, A., Perrin, J., & Courbiere, B., (2010). Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1905–1912.
- Bahsoun, S., Coopman, K., & Akam, E., (2020). Quantitative Assessment of the Impact of Cryopreservation on Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells: up to 24h Post-Thaw and Beyond. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1): 1-15.
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M., & Schallmoser, K., (2016). Human Platelet Lysate: Replacing Fetal Bovine Serum as a Gold Standard for Human Cell Propagation. *Biomaterials*, 76(1): 371-387.
- Caneparo, C., Chabaud, S., Fradette, J., & Bolduc, S., (2022). Evaluation of a Serum Free Medium for Human Epithelial and Stromal Cell Culture. *Internasional Journal of Molecular Sciences*, 23(1): 1-17.
- Devitt, S., Carter, C., Dierov, R., Weiss, S., Gersch, R., & Percec, I., (2015). Successful Isolation of Viable Adipose-Derived Stem Cells from Human Adipose Tissue Subject to Long-Term Cryopreservation: Positive Implications for Adult Stem Cell-Based Therapeutics in Patients of Advanced Age. *Stem Cells Internasional*, 13(1): 1-11.
- Fazzina R, Iudicone P, Mariotti A, Fioravanti D, Procoli A, Cicchetti E, Scambia G, Bonanno G, Pierelli L., (2016). Culture of human cell lines by a pathogen-inactivated human platelet lysate. *Cytotechnology*, 68(4):1185-95.
- Gazali, M., & Tambing, S., (2002). Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati*, 9(1): 27-32.
- Godoy, P., Hewitt, N., & Albrecht, U., 2013. Recent Advances in 2D and 3D in vitro Systems Using Primary Hepatocytes, Alternative Hepatocytes Sources and Non-Parenchymal Liver Cells and Their Use in Investigating Mechanisms of Hepatotoxicity, Cell Signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87(1): 1315-1530.
- Guiotto, M., Raffoul, W., Hart, A., Riehle, M., & Summa, P., (2020). Human Platelet Lysate to Substitute Fetal Bovine Serum in hMSC Expansion for Translational Applications. *Journal of Translational Medicine*, 18(351): 1-14.
- Li, Y., Tan, J., & Li, L., (2010). Comparison of Three Methods for Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells. *Fertil Steril*, 3(3): 999-1005.
- Masson, P., & Lushchekina, S., (2022). Conformational Stability and Denaturation Processes of Proteins Investigated by Electrophoresis under Extreme Conditions. *Molecules*, 27(1): 1-31.
- Maulida, D., Nur, F., Eriani, K., & Muchlisin, Z., (2020). Tinjauan Kepustakaan Tentang Kriopreservasi Sperma Ikan Asli Indonesia. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir, dan Perikanan*, 9(2): 141-150.
- Mentari, D., Pebrina, R., & Nurpratami, D., (2020). Human Platelet Lysate (HPL) as an Alternative Media Propagation of T47D Cells Line. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 11(1): 36-45.
- Oeller, M., Plamberger, S., Krisch, L., Rohde, E., Strunk, D., & Schallmoser, K., (2021). Human Platelet Lysate for Good Manufacturing Practice-Compliant Cell Production. *Molecular Sciences*, 22(1): 1-14.
- Palombella, S., Orfei, C., Castellini, G., Gianola, S., Lopa, S., Mastrogiacomo, M., Moretti, M., & Girolamo, R., (2022). Systematic Review and Meta-Analysis on The Use of Human Platelet Lysate for Mesenchymal Stem Cell Cultures: Comparisons with Fetal Bovine Serum and Considerations on The Productions Protocol. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(142): 1-31.
- Tuschl, G., & Mueller, S., (2006). Effects of Cell Culture Conditions on Primary Rat Hepatocytes Cell Morphology and Differential Gene Expression. *Toxicology*, 218(1): 205-215.
- Uhrig, M., Ezquer, F., & Ezquer, M., (2022). Improving Cell Recovery: Freezing and Thawing Optimization of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*, 11(799): 1-19.
- Utami, R., Ducha, N., & Purnama, E., (2019). Kajian Bovine Serum Albumin (BSA) dalam Pengencer Caudal Epididymal Plasma-D (CEP-D) Terhadap Motilitas Spermatozoa Sapi Limousin Sebelum dan Sesudah Pembekuan. *LenteraBio*, 8(3): 255-259.