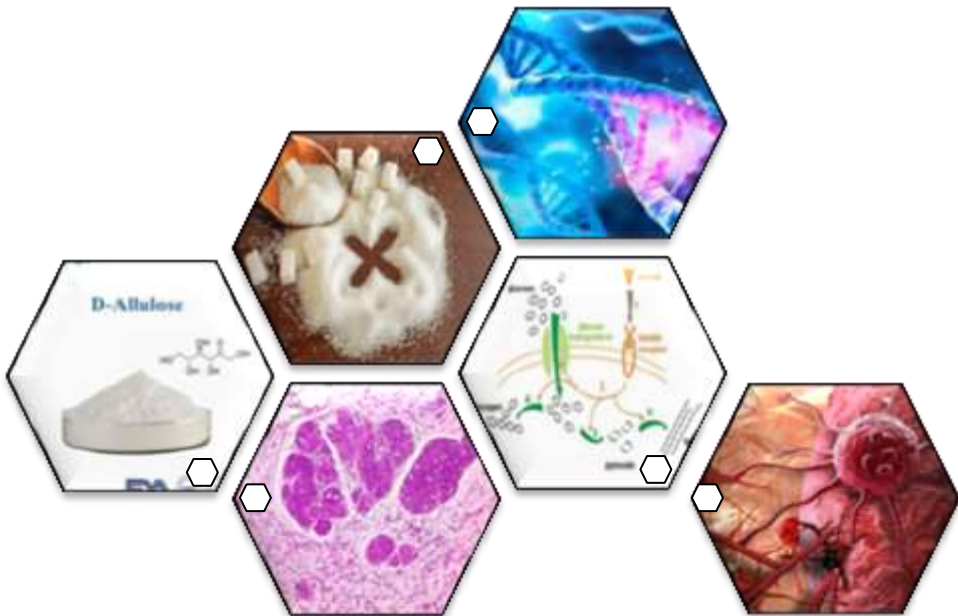


**PENGARUH INDUKSI D-ALLULOSE TERHADAP TINGKAT  
EKSPRESI mRNA GLUT5, GLUT7, DAN GLUT11  
SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

**THE EFFECT OF D-ALLULOSE INDUCTION ON THE mRNA  
EXPRESSION LEVELS OF GLUT5, GLUT7, AND GLUT11  
IN MCF-7 BREAST CANCER CELLS**



**JASMAUNNA**

**P062212025**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2024**

**PENGARUH INDUKSI D-ALLULOZA TERHADAP TINGKAT  
EKSPRESI mRNA GLUT5, GLUT7, DAN GLUT11  
SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

**JASMAUNNA  
P062212025**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**THE EFFECT OF D-ALLULOSE INDUCTION ON THE mRNA  
EXPRESSION LEVELS OF GLUT5, GLUT7, AND GLUT11  
IN MCF-7 BREAST CANCER CELLS**

**JASMAUNNA  
P062212025**



**STUDY PROGRAM OF BIOMEDICAL SCIENCE  
GRADUATE SCHOOL  
HASANUDDIN UNIVERSITY  
MAKASSAR  
2024**

**PENGARUH INDUKSI D-ALLULOSA TERHADAP TINGKAT  
EKSPRESI mRNA GLUT5, GLUT7, DAN GLUT11  
SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

JASMAUNNA  
P062212025

kepada

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**TESIS**

**PENGARUH INDUKSI D-ALLULOZA TERHADAP TINGKAT  
EKSPRESI mRNA GLUT-5, GLUT-7, DAN GLUT-11  
SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

**Yang disusun dan diajukan oleh**

**JASMAUNNA**

**P062212025**

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada 30 Agustus 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada


Program Studi Ilmu Biomedik  
Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan


Pembimbing Utama

  
Prof. dr. Rosdiana Natzir., Ph. D., Sp. Biok(K)  
NIP. 19570326 198803 2 001


Pembimbing Pendamping

  
Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc  
NIP. 19770121 200312 2 003

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik

  
Prof. dr. Rahmawati Minhajat., Ph.D. Sp.PD, K-HOM, FINASIM  
NIP. 19680218 199903 2 002

Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin

  
Prof. dr. Budur, Ph.D. Sp.M(K), M.Med.Ed  
NIP. 19661231 199503 1 009



## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Pengaruh Induksi D-allulosa Terhadap Tingkat Ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, Dan GLUT11 Sel Kanker Payudara MCF-7" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing Prof dr. Rosdiana Natzir., Ph.D., Sp. Biok(K) dan Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 30 Agustus 2024



1EA06ALX325476550

JASMAUNNA

## UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim,

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh. Alhamdulillah rabbi 'alamin, segala puji bagi Allah *Subhaanahu Wata'ala* atas segala berkat, karunia serta perlindungan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "**Pengaruh Induksi D-Allulosa Terhadap Tingkat Ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, dan GLUT11 Sel Kanker Payudara MCF-7**" sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Studi Ilmu Biomedik Konsentrasi Biokimia dan Biologi Molekuler.

Tesis ini tidak akan terwujud tanpa dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih secara khusus kepada:

1. **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.** selaku rektor Universitas Hasanuddin atas fasilitas yang diberikan untuk mendukung proses akademik selama pendidikan di Program Magister di Universitas Hasanuddin
2. **Prof. dr. Budu, Ph.D,Sp.M(K), M.MedEd** selaku dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin beserta staf program Pascasarjana yang telah memberikan bantuan dalam proses penyelesaian tesis ini.
3. **Prof. dr. Rosdiana Natzir.,Ph.D.,Sp.Biok(K)** selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu yang senantiasa memberikan masukan dan arahan dalam penyempurnaan tesis in hingga selesai.
4. **Dr. dr. Ika Yustisia., M.Sc** selaku pembimbing pendamping yang telah banyak berkontribusi dalam proses penyusunan tesis serta dengan sabar membimbing penulis dari proses perencanaan penelitian dan penyusunan tesis ini hingga selesai.
5. **Dr. dr. Marhaen Hardjo., M. Biomed., Ph.D, dr. Lia Hafiyani., M.Pharm,Sc., Ph.D, dan Dr. Sulfahri., S.Si., M.Si** sebagai tim penguji tesis yang banyak memberi masukan dan arahan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis.
6. **Seluruh Dosen dan Staf** di Program Studi Magister Ilmu Biomedis Universitas Hasanuddin, yang telah memberikan ilmu dan pengalaman yang sangat berarti selama masa studi.
7. Penanggung jawab dan staf **Laboratorium HUM-RC** Universitas Hasanuddin Makassar, ibu Hijral Aswad dan ibu Handayani Halik atas kerjasama serta bantuan fasilitas dan pelaksanaan prosedur semasa penelitian.
8. Teman-teman seperjuangan **Program Studi Ilmu Biomedik Konsentrasi Biokimia dan Biologi Molekuler**, yang selalu memberikan semangat, bantuan, dan kebersamaan selama masa studi ini.

Akhirnya, kepada kedua orang tua saya tercinta, almarhum Ayahanda **Jafar** Ibunda **Saleha** saya mengucapkan limpah terima kasih atas doa, pengorbanan, banyak cinta dan kasih sayang, kesabaran, serta memberikan dukungan yang luar biasa baik berupa semangat maupun materi selama ini. Penghargaan dan ucapan terima kasih yang besar juga saya sampaikan kepada Suami tercinta **Zul Iqram**, atas dukungan dan pengertian yang tak henti diberikan agar penulis menyelesaikan studi dengan baik. Tak lupa buah hati tercinta, **Aqeel Akramul Iqram**, yang memberikan kasih sayang dan dukungan setiap harinya secara tak langsung kepada penulis sebagai seorang ibu. Serta adikku **Rahma dan Hikma** atas segala perhatian, pengorbanan, kasih sayang, serta doa yang tiada henti. Seluruh keluarga besar lainnya dan semua pihak yang namanya tidak tercantum atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai. Akhir kata, perkenankan penulis menyampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas segala kesalahan dan kekhilafan baik yang disengaja maupun tidak disengaja selama proses menjalani pendidikan hingga terselesaikannya tesis ini. Akhir kata, penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan manfaat dan kontribusi yang berarti bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang biomedis.

Semoga Allah *Subhaanahu Wata'ala* senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua. Aamiin.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Makassar, 30 Agustus 2024

Penulis,

Jasmaunna

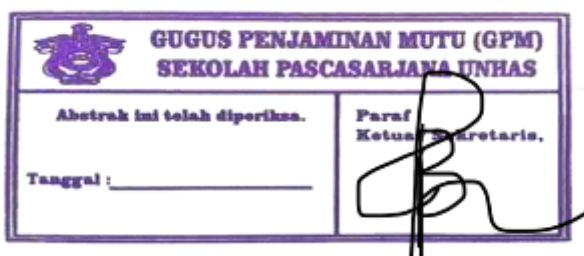


## ABSTRAK

JASMAUNNA. Pengaruh induksi D-allulosa terhadap tingkat ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, dan GLUT11 sel kanker payudara MCF-7 (dibimbing oleh Rosdiana Natsir dan Ika Yustisia)

D-allulosa adalah gula langka rendah kalori yang strukturnya mirip dengan D-fruktosa. Senyawa D-allulosa dapat memasuki sel melalui transporter glukosa dan menghambat glikolisis. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi D-allulosa sebagai inhibitor metabolisme terhadap kanker payudara. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen *in vitro*. Galur sel kanker payudara MCF-7 diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi D-allulosa (6,25, 12,5, dan 25 mM). Viabilitas sel dinilai melalui uji reduksi MTT. Migrasi sel MCF-7 dievaluasi menggunakan uji scratch-assay dan RT-PCR digunakan untuk menentukan ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, dan GLUT11. Studi ini menunjukkan bahwa D-allulosa dapat menghambat viabilitas sel MCF-7 dan kemampuan migrasi sel. Ekspresi mRNA GLUT5 dan GLUT11 pada pemberian D-allulosa meningkat, sedangkan ekspresi mRNA GLUT7 menurun dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian ini menunjukkan bahwa D-allulosa meningkatkan ekspresi mRNA GLUT5 dan GLUT11 serta berpotensi memiliki efek antiproliferasi dan anti-migrasi pada sel kanker payudara. Meskipun mekanisme yang tepat masih belum jelas, gangguan penyerapan glukosa oleh D-allulosa melalui transporter GLUT diharapkan dapat mengubah metabolisme sel-sel abnormal, dan hal ini berpotensi menurunkan pertumbuhan kanker.

Kata kunci: allulosa, transporter, glukosa, fruktosa, transporter monosakarida, viabilitas sel;





## ABSTRACT

JASMAUNNA. **The effect of D-allulose induction on the mRNA expression levels of GLUT5, GLUT7, and GLUT11 in MCF-7 breast cancer cells** (supervised by Rosdiana Natsir dan Ika Yustisia)

D-allulose is a rare, low-calorie sugar that is similar in structure to D-fructose. D-allulose compounds can enter cells through monosaccharide transporters and inhibit glycolysis. This study aims to evaluate the potential of d-allulose as a metabolic inhibitor against breast cancer. This research was conducted using experimental methods *in vitro*. The breast cancer cell line MCF-7, was treated with various concentrations of d- allulose (6.25, 12.5, and 25 mM). Cell viability was assessed through an MTT reduction assay. MCF-7 cell migration was evaluated using the scratch assay and RT-PCR to determine the mRNA expression of GLUT5, GLUT7, and GLUT11. The study demonstrates that d-allulose can inhibit MCF-7 cell viability and cell migration ability. The expression of mRNA GLUT5 and GLUT11 in D-allulose increased, while the expression of mRNA GLUT7 decreased compared with the control treatment. This study indicates that D-allulose increased GLUT5 and GLUT 11 mRNA expression and potentially had antiproliferation and anti-migration effects on breast cancer cells. Although the exact mechanism is still unclear, the disruption of glucose uptake by D-allulose through GLUT transporters is expected to alter abnormal cell metabolism, and this has the potential to decrease cancer growth.

Keywords: allulose, transporter, glucose, fructose, monosaccharide transporters, cell viability;

 <b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris.
Tanggal : _____	

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG .....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	3
1.4. Manfaat Penelitian .....	4
1.5. Teori.....	4
1.6. Hipotesis .....	7
BAB II METODE PENELITIAN.....	8
2.1 Desain Penelitian .....	8
2.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....	8
2.3 Kriteria Sampel Uji .....	8
2.4 Alat dan Bahan.....	8
2.5 Prosedur Sel Kultur .....	9
2.6 Prosedur Perlakuan .....	11
2.7 Analisis Data .....	16
2.8 Alur Penelitian .....	17
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN .....	18
3.1 Hasil .....	18

3.2 Pembahasan .....	25
BAB IV PENUTUP .....	30
4.1. Kesimpulan .....	30
4.2. Saran.....	30
4.3. Keterbatasan penelitian.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN .....	36

## DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
Tabel 1 primer sekuens GLUT5, -7, -11, $\beta$ -actin.....	9
Tabel 2 komposisi medium kultur.....	9
Tabel 3 komposisi media <i>population doubling time</i> .....	11
Tabel 4 komposisi medium perlakuan sel (100 mL).....	12
Tabel 5 master mix PCR.....	15

## DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
Gambar 1 alur penelitian.....	17
Gambar 2 viabilitas sel (MTT assay).....	18
Gambar 3 viabilitas sel (TBE assay).....	19
Gambar 4 luas area penutupan luka sel MCF-7 .....	21
Gambar 5 laju migrasi sel .....	23
Gambar 6 ekspresi relatif mRNA GLUT5, -7, -11 terhadap kontrol HG .....	24
Gambar 7 ekspresi mRNA D-allulosa dan D-fruktosa.....	24
Gambar 8 struktur dan konversi enzimatik D-allulose.....	38
Gambar 9 kerangka konsep.....	39

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
Lampiran 1 Surat Rekomendasi Persetujuan Etik.....	36
Lampiran 2 Surat Keterangan Bebas Laboratorium.....	37
Lampiran 3 Sifat Kimia dan Konversi Enzimatik D-allulosa.....	38
Lampiran 4 Skema Kerangka Teori .....	39
Lampiran 5 Data Statistik Uji Viabilitas (MTT Assay) .....	40
Lampiran 6 Analisis Data Uji Viabilitas (TBE assay) .....	41
Lampiran 7 Analisis Data Migrasi Sel (Migration Rate).....	42
Lampiran 8 Biodata Penulis .....	43

## DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG

Istilah	Arti dan Penjelasan
Angiogenesis	Proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang ada dalam pertumbuhan tumor
Efek Warburg	Peningkatan glikolisis yang disertai dengan penyerapan glukosa yang dipercepat
GLUT	Protein yang berfungsi mengangkut glukosa melintasi membran sel
Glikolisis	Proses metabolisme di mana glukosa dipecah menjadi piruvat, menghasilkan ATP (energi) dan NADH
Glikolisis aerobik	Tingkat konversi glukosa yang terus-menerus menjadi laktat dalam kondisi terdapat oksigen
Metabolisme	Keseluruhan reaksi kimia yang terjadi di dalam organisme untuk mempertahankan kehidupan, termasuk reaksi yang menghasilkan energi, membangun molekul kompleks, dan membuang produk sisa
Onkogen	Gen yang terlibat dalam proliferasi sel dan menyebabkan mutasi pada sel menjadi kanker
Proliferasi	Proses sel membelah dan berkembang biak, menghasilkan lebih banyak sel yang tidak terkendali
Rare sugar (gula langka)	Gula tersedia dalam jumlah terbatas dan sering kali diproduksi melalui proses enzimatik atau fermentasi
Metastasis	Penyebaran sel kanker dari tumor asli ke bagian tubuh lain, di mana sel-sel tersebut dapat membentuk tumor baru

Lambang/singkatan	Arti dan Penjelasan
$\mu$	Mikro
DNA	deoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GLOBOCON	Global Burden of Cancer Study
GLUT	glucose transporter
$K^+$	Kalium
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
mRNA	messenger RNA
MTT	Microtetrazolium
$Na^+$	Natrium
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	real time PCR
WHO	World Health Organization



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kanker adalah penyakit yang dapat menyerang hampir semua organ tubuh ditandai dengan adanya pertumbuhan sel abnormal, tumbuh cepat tidak terkendali, dan dapat menyebar ke bagian tubuh yang lain. Pada tahun 2018, kanker menjadi penyebab kematian kedua secara global, dimana satu dari enam kematian disebabkan oleh kanker. Kanker paru-paru, prostat, kolorektal, lambung, dan hati adalah jenis kanker yang paling umum diantara pria, sedangkan kanker payudara, kolorektal, paru-paru, serviks, dan tiroid adalah yang paling umum pada wanita (WHO, 2022).

Berdasarkan data Global Burden of Cancer Study (GLOBOCAN) dari World Health Organization (WHO) tahun 2020, jumlah kasus baru kanker payudara mencapai 68.858 kasus (16,6%) dari total 396.914 kasus baru kanker di Indonesia. Sementara itu, untuk total kematian sebesar 234.511 kasus. Sedangkan data Riskesdas, prevalensi tumor/kanker di Indonesia menunjukkan adanya peningkatan dari 1,4 di tahun 2013 menjadi 1,79 pada tahun 2018 per 1000 penduduk. Kanker payudara memiliki jumlah kasus baru tertinggi di Indonesia serta menjadi salah satu penyumbang kematian pertama akibat kanker (Kementerian Kesehatan, 2022).

Tingginya kasus kanker menjadi kewaspadaan awal untuk meminimalisir faktor yang berhubungan dengan penyakit kanker tersebut. Pendekatan kesehatan yang murah dan memprioritaskan pencegahan kanker melalui gaya hidup sangat dibutuhkan. Salah satu faktor resiko terjadinya kanker yang berkaitan dengan gaya hidup dan pola makan adalah konsumsi gula berlebih. The ecological associations yang dilaporkan oleh Grasburger et. al., menunjukkan hubungan linier antara konsumsi gula dan kanker payudara (Grasgruber et al., 2018). *The Continuous Update Project*, sebuah upaya gabungan dari World Cancer Research Fund (WCRF) dan American Institute for Cancer Research (AICR) menyimpulkan bahwa ada bukti epidemiologi untuk mendukung hubungan antara minuman manis dan kanker payudara (WCRF, 2018). Studi kohort dalam Black Women's Health Study menunjukkan bahwa wanita yang tidak mengonsumsi minuman manis dibandingkan dengan mereka dengan tingkat asupan  $\geq 250$  g/hari memiliki 27% batas risiko kanker payudara yang signifikan lebih rendah (Nomura et al., 2017). Pertimbangan lain dalam penelitian (Sari, 2019), menemukan kebiasaan konsumsi gula yang tinggi berhubungan dengan meningkatnya risiko kanker payudara yang sejalan dengan penelitian (Sulaiman et al., 2014). Demikian juga studi kohort oleh (Chazelas et al., 2019), konsumsi minuman manis dikaitkan secara positif dengan risiko kanker payudara dan kanker secara keseluruhan.

Gula secara alami terdapat dalam makanan seperti buah-buahan dan produk susu. Namun saat ini, banyak produk makanan yang ditambahkan gula lebih dari setengah total asupan, seperti penganan dan coklat, serta minuman manis. Gula banyak digunakan dalam industri makanan dan dikonsumsi secara ekstensif oleh manusia, karena dapat berfungsi sebagai pengawet makanan atau

produk massal dan rasanya sering dianggap menyenangkan (Van Laar et al., 2021). Lonjakan asupan gula terutama disebabkan oleh konsumsi makanan dan minuman manis, yang diproses atau disiapkan dengan pemanis berkalori, termasuk sukrosa (gula meja), laktosa, maltose, galaktosa, glukosa, dan sirup jagung tinggi fruktosa yang cenderung padat kalori namun kurang nutrisi penting (Herman & Birnbaum, 2021; Makarem et al., 2018).

Glukosa merupakan sumber energi utama untuk metabolisme sel kanker dalam pertumbuhan dan proliferasi (Makarem et al., 2018). Dibandingkan dengan sel normal, sel kanker payudara menunjukkan peningkatan penyerapan glukosa dan tingkat glikolisis secara drastis (Gowrishankar et al., 2011; Lu et al., 2015). Dilaporkan bahwa penyerapan glukosa meningkat pada 60-90% tumor ganas (Yang et al., 2016). Sel-sel kanker biasanya lebih bergantung pada glikolisis aerobik (tingkat konversi glukosa yang terus-menerus menjadi laktat dalam kondisi ada oksigen). Peningkatan glikolisis yang disertai dengan penyerapan glukosa yang dipercepat, dikenal sebagai efek Warburg, setelah ahli biokimia Jerman Otto Warburg yang pertama kali menggambarkan fenomena tersebut pada tahun 1920 (Yang et al., 2016). Sebagai konsekuensi dari peningkatan kebutuhan energi, konsentrasi gula yang lebih tinggi juga diperlukan untuk reaksi anabolik untuk melanjutkan replikasi. Penyerapan gula yang lebih tinggi pada kanker dicerminkan oleh peningkatan aktivitas dan ekspresi yang diperoleh dari transporter gula fasilitatif (GLUT) (Navale & Paranjape, 2016). Gula khususnya fruktosa, memiliki efek buruk pada etiologi kanker, dimana sel kanker dengan mudah memanfaatkan fruktosa untuk mendukung pertumbuhan dan proliferasinya (Makarem et al., 2018). Metabolisme fruktosa dapat didorong dalam kondisi oksigen rendah, sehingga penyerapan glukosa meningkatkan, termasuk produksi asam urat, dan laktat sebagai produk sampingan utama. Fruktosa mempromosikan efek Warburg untuk menurunkan regulasi respirasi mitokondria dan meningkatkan glikolisis aerobik yang dapat membantu metastasis yang awalnya memiliki suplai oksigen rendah. Dalam prosesnya, asam urat dapat memfasilitasi karsinogenesis, merangsang proliferasi sel, dan menghalangi oksidasi asam lemak. Laktat juga dapat berkontribusi terhadap pertumbuhan kanker dengan menekan oksidasi lemak dan menginduksi ekspresi onkogen (Nakagawa et al., 2020). Oleh karena itu, seperti halnya glukosa tidak mengherankan jika fruktosa juga dapat mempengaruhi pertumbuhan, proliferasi, dan kelangsungan hidup sel kanker.

Karena mengonsumsi gula konvensional yang berlebihan dapat berdampak pada kesehatan, dibutuhkan alternatif untuk menurunkan kebutuhan asupan gula kita. Kandidat yang relatif baru untuk menggantikan gula konvensional, dapat ditemukan di antara gula langka. Menurut *International Society of Rare Sugars*, gula langka didefinisikan sebagai monosakarida dan turunannya yang hadir dalam jumlah terbatas di alam. Beberapa gula langka, termasuk lima monosakarida (allulosa, tagatosa, sorbosa, allosa, dan L-arabinosa) dan tiga disakarida (isomaltulosa, trehalosa, dan kojibiosa) (Van Laar et al., 2021). D-allulosa merupakan salah satu monosakarida yang paling intensif dipelajari dengan potensi sebagai pengganti sukrosa yang lebih sehat. D-allulosa (D-ribo-2-hexulose atau D-

psicose) adalah monosakarida langka yang rendah kalori dari produk epimerisasi D-fruktosa pada posisi C-3 (Zhang et al., 2016). Senyawa D-allulosa dapat memasuki sel dari aliran darah melalui transporter glukosa dan menghambat glikolisis. Dengan mempertimbangkan berbagai efek menguntungkan dari D-allulosa dalam studi *in vitro* dan *in vivo* yang belum diketahui kerugian berdasarkan studi metabolik dan toksikologi, D-allulosa saat ini mungkin merupakan gula langka yang paling menjanjikan (Ingram & Roth, 2021).

Monosakarida merupakan gula sederhana yang bersifat hidrofilik sehingga diperlukan protein transporter untuk masuk ke dalam sel seperti GLUT. GLUT merupakan singkatan dari *glucose transporter* yang berperan sebagai transporter glukosa melalui difusi terfasilitasi. Selain glukosa, GLUT memasok sel dengan galaktosa, fruktosa, dan gula lainnya. Kinetika transportasi dan afinitas untuk gula berbeda antara GLUT, dengan mayoritas mengambil lebih dari satu substrat dan beberapa yang dipilih menunjukkan kekhususan substrat (Tanasova & Fedie, 2017) Transporter spesifik fruktosa yang diketahui dalam keluarga transporter glukosa adalah GLUT5, yang dikodekan oleh gen *SLC2A5*. Berdasarkan kesamaan isoform dalam kelas ganjil yaitu, GLUT7 dan GLUT11 yang juga merupakan pengangkut fruktosa (Shin & Koo, 2021). Dalam sel kanker, yang telah terlepas dari regulasi biokimia yang ketat, diketahui terdapat ekspresi menyimpang dari anggota keluarga GLUT yang membantu menyediakan energi yang dibutuhkan untuk proliferasi dan metastasis yang tidak terkendali lebih lanjut (Gowrishankar et al., 2011). Karena D-allulosa merupakan epimer dari fruktosa sehingga kemungkinan masuknya kedua monosakarida tersebut ke dalam sel melalui transporter yang sama.

Berdasarkan uraian di atas, mendorong peneliti untuk melakukan penelitian ini dengan menginvestigasi efek allulosa terhadap ekspresi transporter monosakarida dan pengaruhnya terhadap proliferasi dan kemampuan migrasi pada sel kanker payudara MCF-7.

## **1.2. Perumusan Masalah**

Bagaimana efek suplementasi D-allulosa terhadap proliferasi dan kemampuan migrasi sel, serta ekspresi transporter monosakarida mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 pada sel kanker payudara MCF-7?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek suplementasi D-allulosa terhadap proliferasi dan kemampuan migrasi sel, serta ekspresi transporter monosakarida mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 pada sel kanker payudara MCF-7.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Menginvestigasi efek variasi konsentrasi D-allulosa terhadap proliferasi sel kanker payudara MCF-7.

Menginvestigasi efek variasi konsentrasi D-allulosa terhadap kemampuan migrasi sel kanker payudara MCF-7.

Menginvestigasi efek variasi konsentrasi D-allulosa terhadap ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 pada sel kanker payudara MCF-7.

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1 Manfaat Akademik**

Penelitian ini diharapkan dapat memperluas pengetahuan serta pemahaman tentang dinamika ekspresi transporter glukosa, proliferasi, dan metastasis kanker payudara terhadap allulosa. Selain itu, hasil penelitian ini dapat dijadikan masukan awal bagi peneliti selanjutnya.

##### **1.4.2 Manfaat Aplikatif**

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat berupa informasi bagi masyarakat adanya allulosa sebagai pengganti gula konvensional yang berpotensi sebagai inhibitor metabolisme kanker agar dapat digunakan sebagai terapi tambahan yang potensial.

#### **1.5. Teori**

##### **1.5.1. Kanker Payudara dan Metabolisme Glukosa**

Kanker payudara adalah salah satu kanker paling umum pada wanita, dengan tingginya prevalensi di Indonesia. Namun, data menyebutkan usia, faktor reproduksi, riwayat penyakit payudara pribadi atau keluarga, predisposisi genetik dan faktor lingkungan telah dikaitkan dengan peningkatan risiko perkembangan kanker payudara wanita (Shah, 2014).

Kanker payudara, khususnya subtype MCF-7, dikenal memiliki peningkatan metabolisme glukosa yang berperan penting dalam pertumbuhan sel kanker. Sel-sel kanker memiliki pergeseran metabolik ke glikolisis aerobik yang memainkan peran penting dalam pertumbuhan tumor, perkembangan, dan metastasis. Sel kanker membutuhkan lebih banyak energi dibandingkan sel normal, dan mereka cenderung memanfaatkan glikolisis aerobik untuk proliferasi cepat, meskipun ada oksigen (efek Warburg). Kemungkinan alasan perubahan bioenergi ini adalah kebutuhan untuk menghasilkan produk akhir metabolik lainnya untuk mendukung pertumbuhan dan proliferasi yang cepat di bawah tekanan oksigen rendah, dan kemungkinan adaptasi untuk menghindari kematian akibat agen sitotoksik (Bartrons et al., 2018; Fadaka et al., 2017; Shin & Koo, 2021).

Baru-baru ini, fruktosa telah muncul sebagai kekuatan pendorong utama dalam epidemi sindrom metabolik. Menariknya, fruktosa juga mampu menginduksi disfungsi mitokondria dan menghasilkan stres oksidatif, yang pada gilirannya menekan *aconitase* dalam siklus TCA. Akibatnya, metabolisme fruktosa secara istimewa menurunkan fungsi mitokondria dan secara istimewa merangsang jalur glikolisis. Mengingat fakta ini, fruktosa mungkin menjadi sumber energi alternatif untuk kanker. Fruktosa juga dapat diproduksi secara endogen dalam beberapa kondisi patologis, termasuk diabetes, cedera jantung dan ginjal iskemik, dan sindrom metabolik akibat garam (Nakagawa et al., 2020).

### 1.5.2. Transporter Glukosa Pada Sel Kanker

Sumber energi utama bagi organisme adalah glukosa yang berperan penting dalam metabolisme sel. Glukosa yang berasal dari makanan dan disintesis didalam tubuh diangkut dari sirkulasi ke sel target. Pengangkutan glukosa melintasi membran plasma yang dibutuhkan tubuh. Transporter glukosa fasilitatif (GLUT) mengangkut monosakarida melintasi membran plasma melalui mekanisme difusi terfasilitasi, yang merupakan proses mediasi protein pembawa dengan menuruni gradien konsentrasi antara glukosa diluar dan didalam sel atau sebaliknya. Pada manusia, GLUT dikode oleh empatbelas gen *SLC2A* berbeda dan dibagi berdasarkan spesifitas substrat (Berger & Zdzieblo, 2020; Szablewski, 2020).

GLUT5, GLUT7, dan GLUT11 adalah transporter spesifik yang memediasi penyerapan fruktosa. Kanker payudara telah dilaporkan memiliki peningkatan ekspresi GLUT1-6 dan -12, dan transporter glukosa terpenting untuk pengambilan glukosa pada kanker payudara adalah GLUT1. Kanker payudara menunjukkan peningkatan ekspresi enzim terkait glikolisis. Ekspresi berlebih dari enzim terkait glikolisis dan GLUT pada kanker payudara disebabkan oleh aktivasi jalur pensinyalan yang mengontrol ekspresi enzim pada kanker payudara. Ekspresi berlebih dari enzim terkait glikolisis dan GLUT pada kanker payudara disebabkan oleh aktivasi jalur pensinyalan yang mengontrol ekspresi enzim pada kanker payudara (Shin & Koo, 2021). GLUT5 secara khusus diidentifikasi sebagai transporter fruktosa yang sangat aktif dalam sel kanker payudara MCF-7, sementara GLUT5 tidak ada di jaringan payudara normal (Hamann et al., 2018; Zhou et al., 2017). Para penulis menunjukkan bahwa berkurangnya GLUT5 melemahkan proliferasi dan invasi sel, serta meningkatkan apoptosis. Sebaliknya, ekspresi GLUT5 yang berlebihan meningkatkan proliferasi, migrasi, invasi, dan tumorigenesis sel (Krause & Wegner, 2020; Weng et al., 2018).

### 1.5.3. D-Allulosa sebagai Gula Langka

D-allulosa adalah monosakarida langka yang merupakan epimer dari fruktosa pada posisi C-3 (Zhang et al., 2016). D-glukosa, D-allulosa, dan D-fruktosa adalah monosakarida dengan formula molekul yang sama ( $C_6H_{12}O_6$ ), tetapi berbeda dalam struktur kimianya. Berbeda dengan D-glukosa yang memiliki gugus aldehyd, D-allulosa dan D-fruktosa memiliki gugus keton pada karbon kedua (Jiang et al., 2020; Maeng et al., 2019).

D-allulosa adalah sejenis gula monosakarida rendah kalori dan hadir dalam jumlah yang sangat kecil dalam produk alami (Jiang et al., 2020; Maeng et al., 2019). Senyawa ini pertama kali diidentifikasi dalam gandum pada tahun 1940-an dan hadir dalam jumlah kecil pada makanan tertentu (Ingram & Roth, 2021). Pada tahun 2012, Badan Pengawas Obat dan Makanan AS menyetujui allulosa (GRN No. 400) sebagai bahan yang aman. Sebagai gula, D-allulosa memiliki sifat fungsional yang mirip dengan gula konvensional dan memiliki rasa gula yang khas. Manisnya D-allulosa adalah sekitar 70% dari sukrosa. Karena nilai kalorinya yang rendah yaitu 0,4 kkal/g, D-allulosa hanya memiliki 10% kalori sukrosa. D-allulosa meleleh pada 90°C dan akan membentuk caramel (Jürkenbeck et al., 2022).

#### 1.5.4. Pengaruh D-Allulosa Pada Sel Kanker

Penyerapan D-allulosa terjadi di usus halus dengan efisiensi yang lebih rendah dibandingkan D-glukosa dan D-fruktosa. Absorpsi monosakarida ke dalam enterosit usus halus dimediasi oleh transporter gula yang terletak di membran sel epitel brush border usus halus, sedangkan pembuangan dari enterosit ke lamina propria dimediasi oleh transporter gula yang berbeda yang terletak di membran basolateral (Hossain et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Berbeda dengan D-glukosa, D-allulosa memasuki enterosit oleh transporter pasif GLUT5, yang dikenal sebagai transporter D-fruktosa. Karena kesamaan struktur dengan fruktosa, D-allulosa menggunakan transporter GLUT yang sama seperti GLUT5, yang merupakan satu-satunya protein GLUT dengan spesifisitas tinggi pada D-fruktosa. GLUT2 mengangkut berbagai heksosa termasuk D-glukosa, D-galaktosa, D-manosa, D-fruktosa, dan D-allulosa (Hossain et al., 2015; Suzuki et al., 2022; Zhang et al., 2016).

D-allulosa tidak terlibat dalam metabolisme D-glukosa, sehingga tidak dimetabolisme di hati dan tidak berkontribusi pada produksi energi hati. Manusia memiliki sistem kelenjar keringat yang kaya dan berkembang yang dapat mengeluarkan cairan yang mengandung D-allulosa dalam tubuh. Sebagai tambahan, D-allulosa secara efektif menurunkan aktivitas enzim lipogenik hati dan kadar lipid darah serta gula darah. D-allulosa mengatur lipid darah dengan mengubah aktivitas enzim yang mengatur lipid. D-allulosa dapat mengubah metabolisme kolesterol dengan mengurangi kadar PCSK9 serum. Secara keseluruhan, aktivitas biologis D-allulosa berfokus pada peningkatan toleransi insulin, menghambat kenaikan glukosa darah postprandial, mengurangi akumulasi lemak perut, dan mencegah diabetes (Jiang et al., 2020).

Meskipun D-allulosa dan epimernya yaitu D-fruktosa dimetabolisme dalam tubuh manusia secara berbeda, keduanya mengikuti jalur penyerapan yang sama karena kesamaan dalam strukturnya. Efek D-allulosa pada respon glikemik postprandial dapat disebabkan oleh berbagai mekanisme. Hal ini termasuk penghambatan enzim amilase di seluruh saluran pencernaan, penghambatan transporter glukosa (GLUT) di usus, stimulasi glikogenesis hati, dan pengaturan hormon postprandial yang dipengaruhi oleh glukagon, seperti peptide mirip glukagon-1 (Daniel et al., 2022; Hossain et al., 2015; Xia et al., 2021).

Tinjauan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa D-allulosa menghambat  $\alpha$ -amilase, sukrase, dan maltase pada kelenjar ludah dan usus. Enzim-enzim ini memainkan peran penting dalam memecah karbohidrat kompleks, seperti pati, menjadi gula yang lebih sederhana seperti glukosa. Selain itu, D-allulosa menghambat aktivitas enzim-enzim tersebut yang menyebabkan berkurangnya laju pencernaan pati dan pelepasan glukosa berikutnya. Dengan menghambat pemecahan pati menjadi glukosa, D-allulosa berkontribusi pada penurunan respon glikemik postprandial, sehingga memberikan manfaat potensial untuk mengelola kadar glukosa darah dan kesehatan metabolik (Hossain et al., 2015; Xia et al., 2021).

Perbedaan metabolik yang timbul dari komposisi struktural D-allulosa dan D-fruktosa terutama dipengaruhi oleh konversi enzimatis. Konversi D-fruktosa menjadi D-allulosa yang dikatalisis oleh enzim seperti D-allulose-3-epimerase menginduksi perubahan struktural penting pada posisi C3. Meskipun kedua gula memiliki mekanisme penyerapan yang serupa, modifikasi enzimatis secara signifikan mengubah jalur metabolisme masing-masing (Jiang et al., 2020). Sebuah studi menemukan bahwa D-allulosa menunjukkan perbedaan metabolik dibandingkan dengan D-fruktosa, khususnya dalam hal stabilitas metabolik pada hepatosit manusia dan tikus (Maeng et al., 2019). Kedua monosakarida memasuki sirkulasi sistemik setelah diabsorpsi secara pasif melalui difusi terfasilitasi di usus kecil. Proses pengangkutan ini diperantarai oleh transporter seperti GLUT5 dan GLUT2, yang juga diduga dapat mengangkut D-allulosa. D-fruktosa mengalami metabolisme melalui fosforilasi oleh enzim fruktokinase di hati, yang memulai pembentukan triosa fosfat, yang kemudian dapat diubah menjadi gula cadangan (glikogen) atau lemak. Sebaliknya, D-allulosa memiliki struktur yang berbeda sehingga tubuh tidak dapat menggunakannya dengan mudah. Meskipun termasuk gula sederhana, tubuh hanya sedikit menggunakan D-allulosa, yang sebagian besar akan dikeluarkan melalui urin sehingga tidak memberikan banyak kalori (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2020; Hammond et al., 2024; Hossain et al., 2015).

### **1.6. Hipotesis**

Hipotesis yang disusun dalam penelitian ini adalah:

1. Terdapat perbedaan antara pemberian D-allulosa terhadap proliferasi sel kanker payudara MCF-7.
2. Terdapat pengaruh pada pemberian D-allulosa terhadap migrasi sel kanker payudara MCF-7.
3. Terdapat perbedaan tingkat ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 pada sel kanker payudara MCF-7 dengan variasi konsentrasi D-allulosa.

## **BAB II**

### **METODE PENELITIAN**

#### **2.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan studi *in vitro* yang bertujuan untuk melihat aktivitas penghambatan viabilitas, penutupan luka gores, dan mengamati ekspresi mRNA transporter monosakarida dengan metode Real-Time PCR pada sel kanker MCF-7.

#### **2.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hasanuddin University Medical-Research Center (HUM-RC) Makassar, yang dilaksanakan pada bulan Februari-Oktober 2023.

#### **2.3 Kriteria Sampel Uji**

##### **2.3.1 Kriteria Inklusi**

Sel MCF-7 yang sehat dan berkembang dengan baik.  
Pertumbuhan sel konfluen kepadatan 80% sel/well.  
Sel diamati secara mikroskopis tanpa kontaminasi

##### **2.3.2 Kriteria eksklusi**

Sel yang mati pada proses kultur, atau terkontaminasi mencakup virus, bakteri, jamur maupun parasit.

#### **2.4 Alat dan Bahan**

##### **2.4.1 Alat**

Alat yang digunakan adalah *Bio Safety Cabinet* (BSC), inkubator CO<sub>2</sub>, mikroskop, sentrifuge, vortex, mikropipet, hemacytometer, microplate reader, penggaris, refrigerated centrifuge, heating block, ice-block, spektrofotometer, mikrosentrifus, PCR tubes, thermal cycler, optical strips, Realtime PCR System.

##### **2.4.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu D-allulosa, D-fruktosa, D-glucose, sel kultur MCF-7 berasal dari HUM-RC, media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco cat.-11965092 dan -A1443001), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, Antibiotik *Penicillin-Streptomycin* (PenStrep) 1%, Amphotericin B 250 µg/mL (Gibco), tryPLE select, glutamax, alkohol 70%, stok MTT 5 mg/ml, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Sodium Deodecyl Sulfate* (SDS), blue tip, 96-well plate, 24-well-plate, 6-well plate, conical tube, dan aluminium foil. Bahan yang digunakan dalam uji ekspresi gen yaitu Trizol Reagent, isopropanol, ethanol 75%, kloroform, nuclease freewater, AMV RT-ase 10U/µl, AMV 5x RT buffer, RNase inhibitor 40U/µl, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dan dNTP mix 10mM, DNase I recombinant RNase-



free 1U/ $\mu$ l, KAPPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism, Primer dan probe pradesain Taq-Man Assay-on-Demand GLUT5, GLUT7, GLUT11.

**Tabel 1 primer sekuens GLUT5, -7, -11,  $\beta$ -actin**

Gen Target	Primer Sekuens (5'-3')	Produk (bp)
GLUT5	F : CCTTTGGGTCATCCTTCCA R : ACAGACCACAGCAACGTCAA	145
GLUT7	F : TCGGTGCCTACAGTTTCATC R : AATGCGGTTTATCTCCACAA	113
GLUT11	F : CGTGATGGGACAGGTGGT R : GCTTTCAGGGAGCAGAGG	127
$\beta$ -actin	F : CGCGAGTACAACCTTCTTGC R : ATACCCACCATCACACCCTGG	200

## 2.5 Prosedur Sel Kultur

### 2.5.1 Pembuatan medium kultur

Pembuatan medium kultur (MK) lengkap menggunakan DMEM *high glucose* dengan menambahkan FBS 10%, antifungi (Amphotericin B 1%) dan antibiotik (Penicilin-Streptomycin 1%).

**Tabel 2 komposisi medium kultur**

No.	Komposisi	Jumlah (/100 mL)
1.	DMEM <i>high-glucose</i>	88 mL
2.	FBS 10%	10 mL
3.	Penisilin 10.000 unit; Streptomisin 10 mg/mL (Pen-Strep)	1 ml
4.	Amfotericin B (250 $\mu$ g/mL)	1 ml

### 2.5.2 Thawing sel

- Sel yang telah di freeze dilelehkan dengan cepat (<2 menit) di dalam inkubator CO<sub>2</sub>.
- Sel diencerkan menggunakan medium kultur sebanyak 3 mL dalam tabung sentrifus.
- Sel kemudian disentrifus selama 6 menit dengan kecepatan 1000 rpm.
- Supernatan dibuang, lalu pellet disuspensi kembali kedalam 1 mL medium kultur baru, kemudian dihitung viabilitas dan jumlah sel yang akan ditanam.
- Sel ditumbuhkan didalam *flask* kultur T-25 dengan kepadatan sel 1,0 x 10<sup>6</sup> yang ditambahkan 5 mL medium kultur, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan CO<sub>2</sub> 5%.
- Setiap 3-4 hari atau jika terjadi perubahan warna menjadi kekuningan dilakukan penggantian medium hingga pertumbuhan sel konfluen 80%.

### 2.5.3 Panen sel

- Sel yang telah konfluen 80% dikeluarkan dari inkubator CO<sub>2</sub>.
- Medium dalam *flask* T-25 dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS steril sebanyak 1-2 kali.
- Ditambahkan trypLE select dan diinkubasi di dalam inkubator maksimal 5 menit.
- Ditambahkan 5 ml medium kultur, lalu resuspensi sel secara perlahan dengan pipet hingga sel terlepas dan tidak berkoloni.
- Sel dipindahkan ke dalam tabung sentrifus, sebelum di sub kultur sel dihitung terlebih dahulu.

### 2.5.4 Menghitung jumlah sel

Jumlah sel dihitung sebelum dikultur dan pada saat dipanen, menggunakan *Hemacytometer* dengan prosedur sebagai berikut:

- Sel yang telah dipindahkan ke tabung 15 mL, kemudian disentrifus pada 1000 rpm selama 15 menit.
- Supernatan dibuang, peletnya disuspensikan medium baru sebanyak 1 mL.
- Dipipet kedalam *microtube* steril dan ditambahkan *trypan blue* masing-masing 10 µL, kemudian dihomogenkan.
- Larutan dipipet sebanyak 10 µL ke *Hemacytometer*. Jumlah sel hidup yang berada dalam empat bidang hitung kemudian dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{total sel} = \frac{\text{jumlah sel (Bidang A + B + C + D)}}{4} \times 10^4$$

### 2.5.5 Population doubling time

- Sel yang telah konfluen 80% dipanen dan dihitung, lalu dipindahkan ke tiap sumuran 12 *well plate* ( $0.75 \times 10^5$  sel) dalam 1,5 mL media.
- Distribusi dan keadaan sel diamati di mikroskop dan didokumentasikan.
- *Well plate* disimpan dalam inkubator 37°C dengan CO<sub>2</sub> 5% sampai sel pulih kembali dan menempel secara keseluruhan ( $\pm$  24 jam).
- Dilakukan panen dan penghitungan jumlah sel sesuai dengan prosedur 12-well pada 24, 48, 72 96, dan 120 jam.

$$PDT = \frac{1}{r}$$

$$r = \frac{3,32 (\log N_H - \log N_I)}{(t_2 - t_1)}$$

Keterangan:

r : kecepatan multiplikasi inokulasi

N<sub>I</sub>: jumlah sel saat inokulasi

N<sub>H</sub>: jumlah sel saat dipanen

t<sub>1</sub>: waktu saat inokulasi

t<sub>2</sub>: waktu saat dipanen

**Tabel 3 komposisi media *population doubling time***

No.	Komposisi	Larutan (mL)	
		Fruktosa (100%)	Glukosa (100%)
1	DMEM ( <i>glucose-free</i> )	83,75	83,75
2	Fruktosa (1111 mM)	2,25	-
3	Glukosa (1111 mM)	-	2,25
4	Glutamax (4mM)	2	2
5	<i>Fetal Bovine Serum</i>	10	10
6	Pen-Strep (Penisilin 10.000 unit, Streptomisin 10 mg/mL)	1	1
7	Amfotericin B (250 µg/mL)	1	1

### 2.5.6 Sub-kultur

- Ditambahkan 5 ml medium kultur kedalam T-flask 25.
- Sel diinokulasi sebanyak  $1 \times 10^6$  sel, kemudian dihomogenkan dan diamati kondisi sel di mikroskop.
- Sel dikultur pada suhu  $37^\circ\text{C}$  didalam inkubator dengan  $\text{CO}_2$  5%.
- Keadaan sel diamati pertumbuhannya hingga konfluen 80% untuk melanjutkan prosedur perlakuan.

## 2.6 Prosedur Perlakuan

### 3.6.1 Pengamatan kultur sel dengan medium perlakuan

- Setelah sel yang di sub-kultur konfluen 80%, sel dipindahkan kedalam 6-well plate dengan kepadatan  $5 \times 10^4$  yang berisi 3 mL medium kultur. Setiap selesai satu plate, disuspensi kembali sel agar tetap homogen.
- Kondisi sel diamati di bawah mikroskop, kemudian diinkubasi dalam inkubator  $37^\circ\text{C}$  dengan  $\text{CO}_2$  5%.
- Pada fase logaritmik, medium kultur dibuang dan diganti dengan DMEM free-glucose yang telah diberi perlakuan dengan komposisi medium sebagai berikut.
- Dilakukan pengamatan pada sel kanker payudara MCF-7 pada 0, 24, 48, dan 72 jam setelah diberi perlakuan. Hasil pengamatan dibandingkan dengan sel MCF-7 yang ditumbuhkan pada medium DMEM *high-glucose*.

**Tabel 4 komposisi medium perlakuan sel (100 mL)**

No.	Komposisi	DMEM (Kontrol)	Variasi Uji (mL)					
			Allu 6,25 mM	Allu 12,5 mM	Allu 25 mM	Fru 6,25 mM	Fru 12,5 mM	Fru 25 mM
1.	DMEM <i>free-glucose</i>	85	84.1	82.75	85.5	80.5	82.75	80.5
2.	Glucose 3,3 mM	1	1	1	1	1	1	1
3.	<i>Fetal Bovine Serum</i>	10	10	10	10	10	10	10
4.	Pen-Strep	1	1	1	1	1	1	1
5.	Amfo B (250 µg/mL)	1	1	1	1	1	1	1
6.	D-allu 1111 mM	-	0.9	2.25	4.5	-	-	-
7.	D-fruk 1111 mM	-	-	-	-	0.9	2.25	4.5
8.	Glutamax	2	2	2	2	2	2	2

(Tohi et al., 2022)

### 3.6.2 Proliferasi sel

#### Viabilitas sel.

- Setelah 72 jam, sel pada 6 well-plate diamati dan dipanen
- Viabilitas sel dilakukan dengan pewarnaan *trypan blue* dan dihitung konsentrasi sel secara manual pada hemacytometer di bawah mikroskop (sel yang viabel akan tidak terwarnai dan berpendar di bawah mikroskop cahaya, sedangkan sel yang mati akan terwarnai biru gelap).
- Setiap sampel dilakukan pengulangan hitung sebanyak 4 kali kemudian diambil reratanya. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

#### Uji MTT.

- Sel yang telah konfluen 80% dipanen dan dihitung sesuai protokol.
- Sel dipindahkan ke tiap sumuran *96-well plate* sebanyak 100 µL dengan kepadatan sel  $5 \times 10^3$ . Setiap selesai mengisi 12 sumuran, sel di resuspensi kembali.
- Sel diamati dibawah mikroskop dan didokumentasikan.
- Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan CO<sub>2</sub> 5% sampai keadaan sel pulih kembali.
- Media pada sumuran kemudian dibuang dan ditiriskan dengan membalikkan plate 180° diatas wadah pembuangan reagen/medium, kemudian plate ditekan perlahan diatas tisu.
- Dilakukan pencucian sel dengan 100 µL PBS steril dalam setiap *well*, kemudian PBS dibuang dan ditiriskan.
- Ditambahkan 100 µL media perlakuan, dengan tiga kali pengulangan.
- Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan CO<sub>2</sub> 5%, dilakukan uji pada 24, 48, dan 72 jam setelah diberi perlakuan.

- Media sel dibuang dan dicuci PBS 1x, lalu ditambahkan reagen MTT 100  $\mu\text{L}$  ke setiap sumuran termasuk kontrol media (tidak ditambahkan sel).
- Sel diinkubasi selama 4 jam didalam inkubator sampai terbentuk formazan.
- Diperiksa keadaan sel menggunakan mikroskop inverted. Jika formazan telah terbentuk, ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,01 M HCl sebanyak 100  $\mu\text{L}$ .
- Plate dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi di ruangan gelap pada suhu ruang selama semalaman.
- Absorbansi diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 570 nm.

#### **Parameter pengamatan.**

Parameter yang digunakan dalam metode ini adalah *doubling time*. *Doubling time* merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipatnya.

Reduksi garam tetrazolium merupakan salah satu metode terpercaya untuk menilai proliferasi sel. Aktivitas dehidrogenase laktat meningkat selama proliferasi sel, yang menyebabkan garam Tetrazolium secara bertahap menurun dilingkungan sel yang aktif secara metabolik. Akibatnya, pewarna formazan mengubah warna media pertumbuhan, intensitas ungu yang terbentuk diukur dengan ELISA Reader dengan panjang gelombang 570 nm.

### **3.6.4 Progresivitas sel**

#### **Wound healing.**

- Sel yang telah konfluen 80% dipanen dan dihitung sesuai protokol.
- Sel dipindahkan ke tiap sumuran *24-well plate* sebanyak 500  $\mu\text{L}$  dengan kepadatan sel  $1,0 \times 10^4$ . Setiap selesai mengisi sumuran, sel di resuspensi kembali.
- Sel diamati di mikroskop dan didokumentasikan.
- Sel kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dengan  $\text{CO}_2$  5% sampai keadaan sel pulih kembali.
- Setelah sel pulih kembali, buat *scratch* yang arah dan penekanannya sama tiap sumuran dengan yellow tip tegak lurus dengan bantuan tutup plate yang sudah di lap dengan tissue alkohol.
- Media sel dibuang dari sumuran, lalu dicuci dengan PBS 1x masing-masing 500  $\mu\text{L}$ .
- Kemudian PBS dibuang dari sumuran dengan pipet secara perlahan-lahan, lalu dibilas ulang dengan PBS sampai tidak ada sel yang melayang.
- Ditambahkan variasi konsentrasi sebanyak 500  $\mu\text{L}$  kedalam sumuran, kemudian sel diinkubasi.
- Lalu kondisi sel diamati dengan waktu pengamatan pada 0, 6, dan 24 jam. Jika belum ada perubahan, sel diamati sampai 48 jam.

- Hasil *scratch* didokumentasikan setiap waktu pengamatan dengan perbesaran yang sama minimal 5 lapangan pandang.

### Parameter pengamatan.

Parameter yang digunakan dalam metode ini adalah membandingkan jarak goresan antara kontrol sel dengan perlakuan pada tiap waktu pengamatan. Analisis luas area *scratch* menggunakan software ImageJ. Migrasi sel dihitung sebagai persentase penutupan berdasarkan rumus perhitungan oleh Yue *et al.* (2010). Perbandingan langsung kecepatan migrasi antar kelompok dalam interval waktu tertentu dapat digunakan, terlepas dari perbedaan luas goresan awal.

$$\text{Persentase penutupan} = [(A_{t-0h} - A_{t-\Delta h}) / A_{t-0h}] \times 100\%$$

#### Keterangan :

$A_{t-0h}$  = luas area *wound* yang dihitung langsung pada jam ke-0

$A_{t-\Delta h}$  = luas area *wound* pada jam ke 6 dan 24

$$\text{Laju migrasi sel} = [(A_1 - A_2) / t_2]$$

#### Keterangan :

$A_1$  = luas area *wound* yang dihitung langsung pada pengamatan pertama

$A_2$  = luas area *wound* yang dihitung langsung pada pengamatan kedua

$\Delta t$  = waktu pengamatan

## 2.6.1 Evaluasi ekspresi gen

### Ekstraksi RNA.

Ekstraksi RNA dilakukan dari 6-well plate sebanyak  $5 \times 10^4$  sel/sumuran diisolasi setelah 72 jam dari semua kelompok perlakuan menggunakan kit RNA reagen Trizol (Thermo, USA) dengan protokol sebagai berikut:

- Media sel dibuang dari sumuran dan ditiriskan.
- Sumuran dicuci dengan PBS 1x steril sebanyak dua kali, kemudian dilakukan penambahan Trizol sebanyak 1mL.
- Sampel dimasukkan ke dalam tube 15 mL, kemudian dihomogenkan selama 15 detik dan didiamkan selama 5 menit.
- Ditambahkan 0,2 mL kloroform, dihomogenkan selama 15 detik atau sampai terjadi perubahan warna (merah muda) kemudian didiamkan 2-3 menit.
- Sampel disentrifus di 12000 g pada suhu 4°C selama 15 menit. Suspensi akan terpisah menjadi 3 bagian (merah pada bagian bawah, bagian tengah, dan bagian atas tidak berwarna).

- Suspensi bagian atas (yang tidak berwarna) dipipet dan dipindahkan ke tube baru.
- Ditambahkan isopropanol sebanyak 0,5 mL lalu diinkubasi pada suhu 4°C 10 menit.
- Disentrifus pada 12000 g selama 10 menit dalam suhu 4°C, supernatan dibuang.
- Ditambahkan etanol 75% sebanyak 1 mL lalu divortex, kemudian disentrifus 7500 g pada suhu 4°C, vakum 5-10 menit.
- Ditambahkan selama 5 menit 30µL RNase free water, kemudian dihomogenkan.
- Sampel diinkubasi pada heat block selama 10 menit 55-60°C.

### Mix.

Ekspresi GLUT5, GLUT7, dan GLUT11 dianalisis dengan qRT-PCR menggunakan PCR kit 2x SensiFAST SYBR® Green PCR. Primer yang digunakan adalah primer gen *SLC2A5*, *SLC2A7*, *SLC2A11*.

- Disiapkan *Reaction mix* dengan menghitung jumlah sampel yang akan dengan volume reaksi sebagai berikut:

**Tabel 5 master mix PCR**

No.	Reagen	Volume/reaksi(ul)
1.	2x SensiFAST SYBR Master Mix	10
2.	10 uM Forward Primer	1
3.	10 uM Reverse Primer	1
4.	Template	up to 8
5.	H <sub>2</sub> O	menyesuaikan
	<b>Total volume</b>	<b>20</b>

- Mix reagen ke *microtube* ukuran 1,5 ml, vortex dan spin down selama 5 detik.
- Reagen dialiquot ke tabung strip 8 well masing-masing sebanyak 20 µl.
- Dimasukkan di setiap sumuran masing-masing 5 µl sampel sesuai dengan peta plate PCR sehingga total volume sampel setiap well sebanyak 20 µl.
- Plate ditutup, kemudian spindown dengan sentrifuge plate selama 15 detik, atau hingga tidak ada cairan dan gelembung yang tertinggal di dinding plate.
- Sampel dimasukkan ke dalam mesin qRT- PCR.

### Siklus.

Reaksi qPCR terdiri dari pradenaturasi 95°C selama 15 menit, diikuti dengan 40 siklus reaksi: denaturasi 94°C selama 15 detik, annealing 53°C selama 30 detik, dan polimerasi pada suhu 72°C selama 30 detik.

**Parameter pengamatan.**

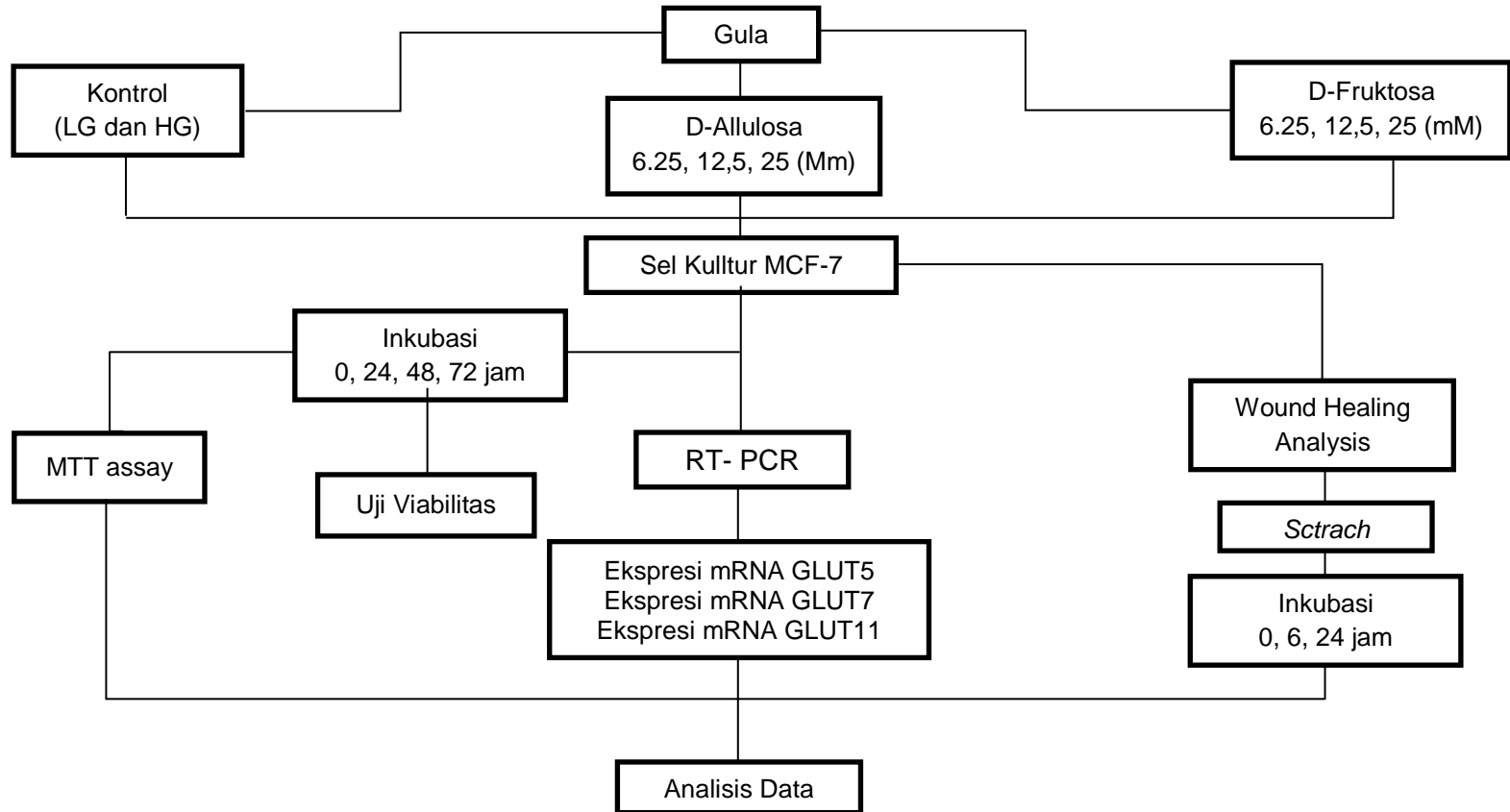
Analisis data *quantification cycle* (cq) dari ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, dan GLUT11, pada kelompok kontrol dan perlakuan dianalisis menggunakan metode Livak. Selanjutnya data dianalisis dengan T-berpasangan.

**2.7 Analisis Data**

Semua percobaan dilakukan dengan tiga kali pengulangan, data dilaporkan dengan nilai rata-rata dan standar deviasi ( $\pm$  SD). Analisa statistik dengan *One-way analysis of variance* (ANOVA) dan uji Post Hoc LSD menggunakan SPSS. Analisis statistik T-Test digunakan untuk menguji perbedaan nilai RFC dari variabel dua kelompok. Visualisasi grafik dengan GraphPad Prism versi 10 (Perangkat Lunak GraphPad, Inc., AS). Nilai signifikan  $P < 0.05$  dianggap signifikan secara statistik.



## 2.8 Alur Penelitian



Gambar 1 alur penelitian