

**EKSPRESI TRANSPORTER GLUT5, 7, 11 DAN RASIO BCL-2/BAX
PADA KULTUR SEL KANKER PAYUDARA MCF7 DENGAN
MEDIUM TINGGI FRUKTOSA**

**HARLINDAH MARGAWATI
P062211012**



**PRODI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**EKSPRESI TRANSPORTER GLUT5, 7, 11 DAN RASIO BCL-2/BAX
PADA KULTUR SEL KANKER PAYUDARA MCF7 DENGAN
MEDIUM TINGGI FRUKTOSA**

**HARLINDAH MARGAWATI
P062211012**



**PRODI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**GLUT5, 7, 11 EXPRESSION AND BCL-2/BAX RATIO IN MCF7
BREAST CANCER CELL CULTURE WITH HIGH FRUCTOSE
MEDIUM**

**HARLINDAH MARGAWATI
P062211012**



**MASTER PROGRAM OF BIOMEDICAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR
2023**

**EKSPRESI TRANSPORTER GLUT5, 7, 11 DAN RASIO BCL-2/BAX
PADA KULTUR SEL KANKER PAYUDARA MCF7 DENGAN
MEDIUM TINGGI FRUKTOSA**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

HARLINDAH MARGAWATI

P062211012

Kepada

**PRODI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

TESIS

EKSPRESI TRANSPORTER GLUT5, 7, 11 DAN RASIO BCL-2/BAX PADA KULTUR SEL KANKER PAYUDARA MCF7 DENGAN MEDIUM TINGGI FRUKTOSA


Disusun dan diajukan oleh

HARLINDAH MARGAWATI
NIM: P062211012

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 18 Agustus 2023
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama


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


Pembimbing Pendamping


dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed., PhD
NIP: 19671212 199903 1 002

**Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik**


dr. Rahmawati Mirhajati, PhD, Sp.PD, K-HOM
NIP: 19680218 199903 2 002

**Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin**


Prof. dr. Budu, PhD, 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 "Ekspresi Transporte GLUT5, 7, 11 dan Rasio Bcl-2/Bax pada Sel Kanker Payudara MCF7 dengan Medium Tinggi Fruktosa" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc sebagai Pembimbing Utama dan dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed., PhD sebagai Pembimbing Pendamping. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. 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, 21 Agustus 2023



Harlindah Margawati
NIM: P062211012

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan Syukur selalu penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala limpahan rahmat dan perlindunganNya sehingga penulisan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Penelitian ini dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapat terampungkan dengan baik atas bimbingan, diskusi dan arahan Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc sebagai Pembimbing Pertama dan dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed., PhD sebagai Pembimbing Kedua. Terimakasih atas kesabaran dalam membimbing penulis selama ini.

Pada kesempatan ini pula penulis ingin mengucapkan apresiasi kepada:

1. Prof.dr. Rosdiana Natzir, PhD., dr. Ilhamuddin Azis, M.Si.,M.Kes.,PhD.,Sp.KJ., dan dr. Lia Hafiyani, M.Pharm.Sci.,PhD selaku penguji, terimakasih atas masukan dan bimbingan yang sangat bermanfaat dalam penulisan tesis ini.
2. dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D., Sp.PD.K-HOM, selaku ketua Program Studi Biomedik dan Prof. Dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.MedEd selaku Dekan Sekolah Pascasarjana dan juga kepada seluruh staf Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin, terimakasih atas kesempatan dan petunjuk selama penulis menjadi mahasiswa.
3. Bidang PPSDM Kemenkes RI terimakasih atas bantuan dana pendidikan.
4. Kepala Kantor serta rekan-rekan kerja di BBLK Makassar terimakasih atas dukungan selama penulis menjalani perkuliahan dan penelitian.
5. dr. Rusdina Bte Ladju selaku Kepala HUMRC Makassar beserta staf tempat penulis melaksanakan penelitian.
6. Orang Tua tercinta Kamaluddin dan Asirah, Abd.Hamid dan Mama Inang, juga kepada saudariku Hasnawati, Herlina, Hartini dan Herviana atas motivasi, doa, dukungan dan kebersamaan yang tak ternilai.
7. Rekan-rekan seperjuangan angkatan 2021 Prodi Ilmu Biomedik Peminatan Biologi Molekuler

Akhirnya penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat dan menjadi sumber ilmu pengetahuan dan dapat dikembangkan pada penelitian selanjutnya.

Penulis,



Harlindah Margawati

ABSTRAK

HARLINDAH MARGAWATI. *Ekspresi Transporter GLUT 5, 7, 11 dan rasio Bcl-2/Bax pada Kultur Sel Kanker Payudara MCF7 dengan Medium Tinggi Fruktosa (dibimbing oleh Ika Yustisia dan Marhaen Hardjo)*

Fruktosa dan glukosa merupakan monosakarida yang dikaitkan dengan perkembangan kanker dalam berbagai penelitian. Transporter glukosa (GLUTs) memfasilitasi penyerapan heksosa ini. Salah satunya GLUT5 yang terekpresi lebih tinggi pada sel kanker dibandingkan jaringan sehat. GLUT7 dan GLUT11 memfasilitasi pengangkutan glukosa dan fruktosa. Namun, ekspresi mereka pada kanker payudara belum dipelajari secara ekstensif. Keluarga Bcl-2 dikenal sebagai pengatur kelangsungan hidup dan kematian sel. Pada penelitian ini, kami menyelidiki efek kombinasi fruktosa-glukosa pada sel kanker payudara MCF7 pada pertumbuhan, migrasi, dan ekspresi GLUT5, GLUT7, GLUT11, dan rasio Bcl-2/Bax. Sel kanker payudara (MCF7) ditumbuhkan dalam media dengan fruktosa, glukosa, dan beberapa kombinasi keduanya (75%:25%, 50%:50%, 25%:75%). UjiMTT dilakukan untuk melihat perkembangan sel kanker. Migrasi sel diperiksa dengan uji *wound healing*. Evaluasi ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11, dan Bcl-2/Bax melalui *Quantitative real-time polymerase chain reaction* (qPCR). Dari penelitian ini diperoleh kombinasi fruktosa dan glukosa secara signifikan meningkatkan pertumbuhan sel dan persentase penutupan dibandingkan dengan sel dalam media dengan kandungan fruktosa saja. Ekspresi mRNA untuk GLUT5 dan GLUT7 tinggi pada kombinasi fruktosa 75%, glukosa 25%, sementara GLUT11 terekpresi rendah pada semua perlakuan. Rasio Bcl-2/Bax tertinggi pada sel yang diberi kombinasi fruktosa 25%, glukosa 75%. Sebagai kesimpulan, penelitian kami mengungkapkan bahwa pemberian kombinasi fruktosa-glukosa mempengaruhi perkembangan, migrasi, ekspresi GLUT5, GLUT7, GLUT11, dan rasio Bcl-2/Bax pada sel kanker payudara MCF7.

Kata Kunci: *Kanker payudara, fruktosa, glukosa, GLUT5, GLUT7, GLUT11, Bcl-2/Bax*



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

ABSTRACK

HARLINDAH MARGAWATI. *GLUT5, 7, 11 Expression and Bcl-2/Bax ratio in MCF-7 Breast Cancer Cell Culture with High Fructose Medium* (supervised by **Ika Yustisia dan Marhaen Hardjo**)

Fructose and glucose are monosaccharides that have been linked to the growth of cancer in many studies. These hexoses are absorbed via glucose transporters (GLUTs). For example, GLUT5 is expressed higher in cancer cells than healthy tissue. GLUT7 and GLUT11 also transport glucose and fructose. However, their expression in breast cancer has not been studied extensively. The Bcl-2 family is known as a regulator of cell survival and death. In this study, we investigated the effect of the fructose-glucose combination on MCF7 breast cancer cells on growth, migration, and expression of GLUT5, GLUT7, GLUT11, and Bcl-2/Bax ratios. Breast cancer cells (MCF7) were grown in media with fructose, glucose, and some combination of the two (75%:25%, 50%:50%, 25%:75%). The MTT test is performed to see the development of cancer cells. Cell migration was checked by wound healing assay. Evaluation of GLUT5, GLUT7, GLUT11, and Bcl-2/Bax mRNA expression by Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). This study demonstrated that cell growth and closure proportions increased dramatically when fructose and glucose were combined. mRNA expression for GLUT5 and GLUT7 was high in the combination of 75% fructose and 25% glucose, while GLUT11 was low in all treatments. The highest Bcl-2/Bax ratio was found in cells given a combination of 25% fructose and 75% glucose. In conclusion, fructose-glucose combination influenced MCF7 breast cancer cell growth, migration, and expression of GLUT5, GLUT7, GLUT11, and the Bcl-2/Bax ratio.

Keywords: *Breast cancer, fructose, glucose, GLUT5, GLUT7, GLUT11, Bcl-2/Bax*

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

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II METODE PENELITIAN	5
2.1 Tempat dan Waktu.....	5
2.2 Bahan dan Alat	5
2.3 Posedur	5
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	12
3.1 Hasil.....	12
3.2 Pembahasan	17
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN.....	21
4.1 Kesimpulan.....	21
4.2 Saran	21
DAFTAR PUSTAKA	22
LAMPIRAN	28

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Komposisi medium kultur sel	6
2. Komposisi media perlakuan.....	8
3. Urutan primer gen yang digunakan	11
4. Hasil foto dari setiap konsentrasi perlakuan pada jam ke-0 dan ke-6	13

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Grafik pertumbuhan sel MCF7.....	12
2. Grafik persentase penutupan sel MCF7.....	15
3. Ekspresi GLUT pada sel MCF7.....	16
4. Ekspresi relatif Bcl-2, Bax dan rasio Bcl-2/Bax pada sel MCF7.....	16
5. Bagan hasil penelitian secara keseluruhan.....	20

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/Singkatan

MCF7

GLUT

Bcl-2

BclXL

Mcl-1

Bax

Bak

 μ

ER

HER2

BH3

DNA

TNFR

RIPK

Arti/Penjelasan

Michigan Cancer Foundation 7

Glucose transporter

B-cell lymphoma-2

B-cell lymphoma-extra large

Myeloid cell leukemia-1

Bcl-2-associated-X

Bcl-2 homologous killer

mikro

Estrogen reseptor

Human epidermal growth factor receptor 2

Bcl-2 homology 3

Deoxyribonucleic acid

Tumor necrosis factor receptors

Receptor interacting protein kinase

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu ciri khas (*Hallmark*) sel kanker adalah adanya perubahan regulasi metabolisme. Sel kanker dapat beradaptasi melalui metabolisme kompleks tidak hanya berkaitan dengan faktor genetik, tetapi menyesuaikan dengan nutrisi di lingkungan sekitarnya (Elia and Haigis 2021; Weng, Fan, et al. 2018). Seperti terjadinya peningkatan glikolisis aerobik dan anabolisme yang mendukung pertumbuhan, proliferasi, dan resistensi pada sel kanker (Fernández, Gómez de Cedrón, and Ramírez de Molina 2020).

Karbohidrat merupakan penyedia energi utama dalam aktivitas metabolik. Glukosa merupakan salah satu jenis karbohidrat, diketahui sebagai sumber energi untuk sel kanker, dimana glukosa difermentasi menjadi asam laktat meskipun dalam keadaan aerob (glikolisis aerob), yang dikenal sebagai efek Warburg (Han et al. 2021). Hal ini didukung oleh penelitian Goncalves *et al.*, tahun 2019, yang memaparkan bahwa sel kanker mengkonsumsi banyak glukosa untuk mempertahankan proliferasi sel secara terus-menerus. Akibatnya berdampak pada *tumor microenvironment* (TME) (Scharping and Delgoffe 2016), yaitu salah satunya terjadi penurunan kadar glukosa di sekitar sel kanker (Xu et al. 2015). Sehingga, sel kanker memerlukan nutrisi alternatif sebagai pengganti glukosa untuk mempertahankan keberadaannya (Scharping and Delgoffe 2016).

Fruktosa juga merupakan salah satu monosakarida yang terdapat pada buah-buahan dan sayuran, yang memiliki rasa lebih manis daripada sukrosa (glukosa + fruktosa) yang merupakan gula utama di masyarakat (Das 2015), sehingga banyak digunakan sebagai pemanis pada minuman seperti *soft drinks* dan makanan manis lainnya seperti permen (Barclay et al. 2012; Mai and Yan 2019). Beberapa hasil penelitian menunjukkan, konsumsi fruktosa secara berlebihan berdampak pada sindroma metabolik dan progresi tumor (Charrez, Qiao, and Hebbard 2015; Nakagawa, Lanaspa, Andres-Hernando, et al. 2020). Makanan dengan kandungan tinggi fruktosa juga dapat menyebabkan kerusakan hati dan meningkatkan resiko beberapa jenis kanker (S. Fan et al. 2019; Hsieh et al. 2017; Yustisia et al. 2022). Sama seperti glukosa, metabolisme fruktosa pada

sel kanker juga memberikan kontribusi pada efek Warburg dengan meningkatkan glikolisis melalui produksi asam laktat (Han et al. 2021).

Pada kanker payudara yang saat ini masih memiliki angka kematian yang tinggi, dibandingkan dengan glukosa, fruktosa menyebabkan peningkatan migrasi agresif (Monzavi-Karbassi 2010). Selain itu, fruktosa melalui jalur 12-Lipoxygenase juga menstimulasi perkembangan dan metastasis kanker payudara (Jiang et al. 2016). Penelitian menggunakan sel *line* kanker payudara MCF7 (*Michigan Cancer Foundation 7*) menunjukkan bahwa fruktosa dapat digunakan sebagai sumber energi pengganti glukosa. Hal ini didukung oleh penelitian Liang *et.al.*, 2021, dimana beberapa sel *line* termasuk sel kanker payudara MCF7 memperlihatkan pertumbuhan di media yang mengandung glukosa maupun fruktosa. Dari penelitian tersebut, salah satu glukosa transporter (GLUT), yaitu GLUT5 terdeteksi overekspresi dibandingkan dengan sel *line* normal. GLUT diketahui berperan dalam aktivitas biokimia dengan mempertahankan kebutuhan energi sel tumor dengan memediasi masuknya glukosa ke dalam sel (Ancey, Contat, and Meylan 2018). Fruktosa masuk melalui GLUT5 pada organ yang normal seperti hati, pankreas atau usus. Begitupun pada demonstrasi beberapa sel kanker, fruktosa masuk ke dalam sel dengan bantuan GLUT5 (Liang et al. 2021).

GLUT5 diketahui meningkatkan asupan fruktosa pada leukimia mieloid akut ketika kadar glukosa menurun (Chen et al. 2016). Overekspresi GLUT5 juga ditemukan pada kanker kolon (Włodarczyk et al. 2021), adenokarsinoma paru (Weng, Zhu, et al. 2018), dan glioma (Su, Li, and Gao 2018). Namun *Knockdown* GLUT5 dengan siRNA pada sel *line* kanker payudara MCF7 memperlihatkan tidak terjadi perubahan yang signifikan terhadap penyerapan fruktosa, mengindikasikan bahwa GLUT5 bukan satu-satunya transporter yang berperan dalam sel kanker tersebut (Gowrishankar et al. 2011). GLUT5 termasuk dalam kelas 2 bersama dengan GLUT7 dan GLUT11 yang merupakan fasilitatif transporter untuk fruktosa (Ismail and Tanasova 2022). Namun, GLUT7 dan GLUT11 belum banyak dilakukan penelitian pada sel kanker payudara. Penelusuran dari data (The Human Protein Atlas n.d.) pada kanker payudara juga terdapat ekspresi GLUT7 dan GLUT11.

Eksposur fruktosa juga menimbulkan stres oksidatif, menyebabkan disfungsi mitokondria yang memicu kematian sel (Jaiswal et al. 2015). Protein yang termasuk dalam keluarga Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) merupakan pengatur

keseimbangan antara kelangsungan hidup dan kematian sel (Adams and Cory 2018). Protein Bcl-2 *prosurvival*, antara lain: Bcl-2, *B-cell lymphoma-extra large* (BclXL), *Myeloid cell leukemia-1* (Mcl-1), mengikat dan menghambat *killer* protein *Bcl-2-associated-X* (Bax) dan *Bcl-2 homologous killer* (Bak) (Bata and Cosford 2021). Pada sel kanker, protein Bcl-2 diketahui melindungi sel dari efek obat kemoterapi (Al-Dhfyhan et al. 2022). Peningkatan rasio Bcl-2/Bax pada sel MCF7 juga dikaitkan dengan resistensi terhadap paclitaxel (Sharifi et al. 2014). Tranfeksi siRNA HCCR-1 (*Human cervical cancer gene* merupakan onkogen yang terdeteksi overekspresi pada kanker payudara) memperlihatkan peningkatan ekspresi Bax mengakibatkan penurunan proliferasi sel kanker MCF7 (Meng et al. 2019). Pada penelitian lain, pemberian 100g/ml Oxymatrine pada sel kanker payudara MCF7, memperlihatkan ekspresi mRNA Bax sebesar 169% pada 72 jam dan penurunan level mRNA Bcl-2 sebesar 24% pada waktu yang sama (Lin, Li, and Zhang 2016). Adapun efek pemberian variasi konsentrasi fruktosa pada sel kanker payudara MCF7 terhadap rasio Bcl2/Bax belum diketahui.

1.2 Tujuan Penelitian

1.2.1 Tujuan umum

Mengevaluasi peran fruktosa pada perkembangan sel kanker payudara MCF7 melalui ekspresi transporter GLUT 5, 7, dan 11 serta Bcl2/Bax.

1.2.2 Tujuan khusus

- Membandingkan pertumbuhan sel kanker payudara MCF7 pada medium dengan konsentrasi fruktosa yang bervariasi.
- Mengukur ekspresi GLUT5, GLUT7 dan GLUT11 pada sel kanker payudara MCF7 dalam medium dengan konsentrasi fruktosa yang bervariasi.
- Mengidentifikasi efek pemberian variasi konsentrasi fruktosa terhadap tingkat rasio Bcl2/Bax pada sel kanker payudara MCF7.

1.3 Manfaat Penelitian

1.3.1 Manfaat teoritis

Diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efek fruktosa pada sel kanker dan digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

1.3.1 Manfaat praktis

- Bagi masyarakat

Menambah pengetahuan mengenai efek samping konsumsi fruktosa berlebihan yang terkandung dalam minuman dan makanan manis kemasan.

- Bagi pemerintah
Memberikan informasi mengenai peran fruktosa pada sel kanker, sehingga dapat membuat aturan mengenai kadar kandungan fruktosa dalam makanan dan minuman yang beredar di masyarakat.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC) Makassar, dari bulan Januari sampai Juni 2023.

2.2 Bahan dan Alat

2.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu sel MCF7, fruktosa, *glucose solution*, alkohol 70%, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Penicillin-Streptomycin* (PenStrep), Amphotericin-B, *Tryple select*, MTT, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Sodium Deodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl, tips, *flask 25 cm²*, *24-well plate*, *96-well plate*, dan aluminium foil, *trypan blue*, Trizol, kloroform, isopropanol, etanol 75%, *nuclease free-water*, *primer*, SYBR, agarose, TAE 1X, EtBr, *loading dye*.

2.2.2 Alat

Alat yang digunakan adalah Bio Safety Cabinet (BSC), sentrifus, Inkubator CO₂, waterbath, vortex, mikropipet, inverted mikroskop dan microplate reader, *haemocytometer*, qPCR, alat elektroforesis.

2.3 Posedur

2.3.1 Persiapan kultur sel

- Pembuatan media

Sebelum memulai kultur sel, terlebih dahulu disiapkan media yang akan digunakan yaitu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle*) dengan penambahan *Fetal Bovin Serum* 10%, Amphotericin B 1% sebagai antifungi dan Penicilin-Streptomycin 1% sebagai anti bakteri dengan komposisi sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi medium kultur sel

NO.	KOMPOSISI	JUMLAH (/100 mL Medium)
1.	DMEM	88 mL
2.	<i>Fetal Bovine Serum</i>	10 mL
3.	Pen-Strep (Penisilin 10.000 unit, Streptomisin 10 mg/mL)	1 ml
4.	Amphotericin B (250 µg/mL)	1 ml

- *Thawing*

1. Satu vial dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ selama kurang lebih 2 menit hingga bekuan sel setengah mencair.
2. Sel kemudian dipipetkan ke dalam tabung sentrifus 15 ml yang berisi 3 mL medium DMEM yang telah disiapkan sebelumnya.
3. Suspensi sel disentrifugasi 1000 rpm selama 5 menit.
4. Supernatan dibuang sementara pelet sel disuspensi kembali dengan 1 mL medium DMEM baru kemudian dihitung viabilitas dan jumlah sel yang siap ditanam.
5. Selanjutnya sel ditanam ke dalam *flask* 25cm² berisi 5 mL medium DMEM dan inkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, pada suhu 37°C.
6. Lakukan penggantian medium setelah 3-4 hari atau ketika terjadi perubahan warna. Observasi dilakukan setiap hari, hingga jumlah sel yang tumbuh sekitar 80 – 90% luas permukaan lapangan pertumbuhan.

- Perhitungan jumlah sel

Sebelum dilakukan perlakuan, sel yang akan disubkultur terlebih dahulu dihitung jumlah sel yang akan diinokulasi. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan *Haemocytometer* dengan cara sebagai berikut:

1. Media dalam *flask* dibuang, kemudian sel dicuci 1x dengan PBS steril.
2. Tambahkan *Tryple select* sebanyak 500 µL untuk melepas sel yang melengket di dasar *flask* (proses ini dilakukan tidak lebih dari 5 menit).

3. Tambahkan medium pertumbuhan baru sebanyak 3 mL dan dipindahkan ke tabung 15 mL kemudian disentrifus pada 1000 rpm selama 5 menit.
4. Supernatan dibuang dan peletnya disuspensikan dengan medium baru sebanyak 1 mL.
5. Dipipet sebanyak 10 μ L ke *microtube* steril dan ditambahkan 10 μ L *trypan blue*, dihomogenkan.
6. Dipipet sebanyak 10 μ L ke *Hemacytometer*
7. Hitung jumlah sel dalam 4 segiempat bidang hitung.

$$\text{Total sel} = \frac{\text{jumlah sel dari 4 bidang hitung} \times \text{faktor dilusi} \times 10^4}{4}$$

- Subkultur sel

Setelah mengetahui jumlah sel, kemudian dilakukan subkultur pada *flask* 25cm², dengan prosedur sebagai berikut:

1. Pipet media sebanyak 5 mL ke dalam *flask* 25cm²
2. Inokulasi sebanyak 1 x 10⁶ sel
3. Amati pertumbuhan setiap hari hingga pertumbuhan mencapai 80-90%, baru kemudian dilanjutkan ke perlakuan berikutnya.

2.3.2 Penentuan *population doubling time* (PDT) sel MCF7

PDT menunjukkan waktu yang diperlukan oleh populasi sel untuk tumbuh dua kali lipat dari jumlah sel saat inokulasi, digunakan untuk memperkirakan waktu siklus sel. PDT dibuat berdasarkan hasil uji MTT menggunakan medium pertumbuhan. Perhitungan PDT menggunakan rumus di bawah ini:

$$\text{PDT} = 1/r$$

$$r = 3,32 (\log N_H - \log N_I) / (t_2 - t_1)$$

Keterangan:

r : kecepatan multiplikasi inokulasi

N_I: jumlah sel saat inokulasi

N_H: jumlah sel saat dipanen

t₁ : waktu saat inokulasi

t₂ : waktu saat dipanen

2.3.3 Pengamatan kultur sel dengan medium fruktosa

Setelah subkultur sel mencapai kepadatan 80%, sel kemudian dipindahkan ke 6 *well plate* berisi 3 mL medium pertumbuhan dengan densitas 2×10^5 sel tiap *well*. Kemudian dimasukkan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Setelah PDT tercapai, medium diganti dengan DMEM *glucose-free* ditambah fruktosa dan glukosa dengan perbandingan berturut-turut 100, 75:25, 50:50, 25:75, 100 dengan komposisi medium sebagai berikut:

Tabel 2. Komposisi media perlakuan

NO	KOMPOSISI	Variasi					
		Fruktosa 100%	Fru: 75% Glu: 25%	Fru: 50% Glu: 50%	Fru: 25% Glu: 75%	Glukosa 100%	Kontrol
1	DMEM <i>glucose-free</i>	83,75 ml	83,75 ml	83,75 ml	83,75 ml	83,75 ml	86 ml
2	Fruktosa (25 mM)	2,25 ml	1,6875 ml	1,125 ml	0,5625 ml	-	-
3	Glukosa (25 mM)	-	0,5625 ml	1,125 ml	1,6875 ml	2,25 ml	-
4	Glutamax	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
5	<i>Fetal Bovine Serum</i>	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
6	Pen-Strep (Penisilin 10.000 unit, Streptomisin 10 mg/mL)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
7	Amphotericin B (250 µg/mL)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Pengulangan masing-masing 3 kali setiap variasi dan dilakukan pengamatan pada 24, 48, 72 dan 96 jam.

2.3.4 Uji MTT

Transfer sel ke dalam 96 *well plate* masing-masing dengan kepadatan 5×10^3 sel, inkubasi selama 24 jam di dalam inkubator 5% CO₂. Tambahkan media perlakuan dengan masing-masing 3 kali pengulangan dan dilakukan uji pada 24, 48, 72 dan 96 jam. Pengujian menggunakan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dengan cara:

1. Ambil sel dari inkubator CO₂, amati kondisi sel.
2. Gunakan kultur sel dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen.
3. Panen dan hitung jumlah sel sesuai dengan prosedur.
4. Transfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 μ l dengan kepadatan 5×10^3 sel. Setiap kali mengisi sumuran, resuspensi kembali sel agar tetap homogen.
5. Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel. Dokumentasikan.
6. Inkubasi sel di dalam inkubator selama semalam (agar sel pulih kembali setelah panen).
7. Buang media sel (balikkan plate 180° di atas tempat buangan, kemudian tekan plate secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan)
8. Masukkan 100 μ l PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik plate. Tiriskan sisa cairan dengan tisu.
9. Masukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran (triplo).
10. Inkubasi di dalam inkubator, lakukan uji pada 24, 48, 72 dan 96 jam setelah diberi perlakuan.
11. Buang media sel, cuci PBS 1x dan tambahkan reagen MTT 100 μ l ke setiap sumuran, termasuk kontrol (tanpa sel)
12. Inkubasi sel selama 4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan).
13. Periksa kondisi sel dengan mikroskop inverted. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCl.
14. Bungkus plate dengan aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.
15. Ukur absorbansi dengan *microplate reader* pada 620 nm

2.3.5 *Scratch wound healing assay*

Metode ini dilakukan untuk mengamati migrasi sel kanker secara *in vitro*.

1. Sel ditumbuhkan pada 24 *well plate* dengan kepadatan 5×10^4 sel/well
2. Sel diinkubasi pada suhu 37°C yang disuplai 5% CO_2 sampai mencapai minimal 80% konfluensi.
3. Dibuat *scratch* pada permukaan dasar sumuran menggunakan ujung pipet tip steril. Diusahakan membuat ukuran *scratch* yang sama untuk sumuran perlakuan dan kontrol.
4. Media lama dibuang dan sel dicuci dengan PBS steril sebanyak dua kali.
5. Sel kemudian diberikan larutan perlakuan glukosa-fruktosa dan diinkubasi suhu 37°C yang disuplai 5% CO_2 ,
6. Dilakukan pengamatan pada jam ke-0 dan 6 jam setelah perlakuan.
7. Foto pengamatan diambil dengan menggunakan mikroskop inverted pada perbesaran yang sama.
8. Hasil *scratch assay* dianalisis menggunakan software ImageJ.
9. Migrasi sel dihitung sebagai persentase penutupan (*wound closure percentage*) berdasarkan perhitungan sebagai berikut:

$$\left[\frac{(A_{t-0h} - A_{t-\Delta h})}{A_{t-0h}} \right]$$

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

2.3.6 Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA dilakukan dengan Trizol dari sel yang dikultur pada 6 *well plate* sesuai protokol reagen.

1. Media dari sumuran dikeluarkan terlebih dahulu
2. Lakukan pencucian 2x dengan PBS steril
3. Tambahkan Trizol 1 mL
4. Masukkan dalam *tube* 1,5 μL , homogenkan selama 15 detik, diamkan selama 5 menit
5. Tambahkan 0,2 mL chloroform, kocok 15 detik/ sampai suspensi berwarna merah muda, diamkan 2-3 menit

6. Sentrifus di 12000 *g* pada suhu 4°C selama 15 menit. Suspensi akan terpisah menjadi 3 bagian, merah di bagian bawah, bagian tengah putih dan bagian atas yang bening (tidak berwarna).
7. Pipet bagian yang tidak berwarna ke *tube* baru
8. Tambahkan 0,5 mL isopropanol, inkubasi 10 menit pada suhu 4°C
9. Sentrifus selama 10 menit pada 12000 *g*, suhu 4°C. Buang supernatan
10. Tambahkan 1 mL etanol 75%, vortex kemudian sentrifus 7500 *g* pada suhu 4°C selama 5 menit, vakum 5-10 menit
11. Tambahkan 30µL *RNase free water*, homogenkan

2.3.7 Deteksi ekspresi GLUT dan Bcl-2/Bax

Ekspresi gen GLUT5, GLUT7, dan GLUT11 serta Bcl-2/Bax dipreparasi menggunakan PCR kit 2x SensiFAST™ SYBR. Prosedur qRT-PCR dilakukan dengan cara:

1. Isi mix reagen ke *microtube* ukuran 1,5 ml, *spin down* selama 5 detik.
2. Aliquot ke dalam *plate* masing-masing 9 µl sesuai jumlah sampel
3. Masukkan masing-masing 1 µl sampel.
4. Tutup *plate*, kemudian *spindown* dengan *sentrifuge plate* selama 15 detik, atau hingga tidak ada cairan dan gelembung tertinggal di dinding *plate*
5. Masukkan ke dalam mesin qRT- PCR.

Adapun urutan primer yang digunakan adalah sebagai berikut:

Tabel 3. Urutan primer gen yang digunakan

Gen	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Product Size (bp)
GLUT5	CCTTTGGGTCATCCTTCCA	ACAGACCACAGCAACGTCAA	145
GLUT7	TCGGTGCCTACAGTTTCATC	AATGCGGTTTATCTCCACAA	113
GLUT11	CGTGATGGGACAGGTGGT	GCTTTCAGGGAGCAGAGG	127
Bcl-2	CCGGAGAACAGGGTATGATA	TCAGGCAAGGAAGAAGATGC	151
Bax	GGAGACACCTGAGCTGACCTTG	CTGCCACACGGAAGACCTC	170
β-actin	CGCGAGTACAACCTTCTTGC	ATACCCACCATCACACCCTGG	200

2.3.8 Analisis data

Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Data yang diperlihatkan berupa rata-rata±SD dari hasil yang diperoleh, dengan uji *Analisis of variance* (Anova) menggunakan SPSS. Grafik yang ditampilkan dibuat dengan Graphpad Prism.