

**PENGARUH INDUKSI FRUKTOSA TERHADAP EKSPRESI
mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 dan KRAS PADA SEL KANKER
KOLOREKTAL WiDr**

NURUL HIDAYAH S. B.

P062211006



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**PENGARUH INDUKSI FRUKTOSA TERHADAP EKSPRESI
mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 dan KRAS PADA SEL KANKER
KOLOREKTAL WiDr**

NURUL HIDAYAH S. B.

P062211006



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**FRUCTOSE INDUCTION EFFECT ON GLUT5, 7, 11, AND KRAS
EXPRESSIONS mRNA IN HUMAN COLORECTAL CANCER
WiDr CELL LINE**

**NURUL HIDAYAH S. B.
P062211006**



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**PENGARUH INDUKSI FRUKTOSA TERHADAP EKSPRESI
mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 dan KRAS PADA SEL KANKER
KOLOREKTAL WiDr**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

NURUL HIDAYAH S. B.

P062211006

kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

TESIS

PENGARUH INDUKSI FRUKTOSA TERHADAP EKSPRESI mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 dan KRAS PADA SEL KANKER KOLOREKTAL WiDr


Disusun dan diajukan oleh

NURUL HIDAYAH S. B.
NIM: P062211006


Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 15 November 2023
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui


Pembimbing Utama


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

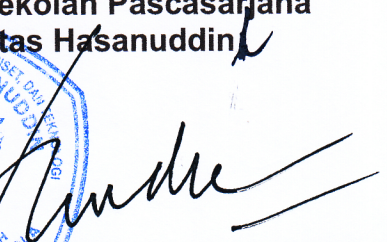
Pembimbing Pendamping


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

**Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik**


dr. Rahmawati Minhajat, 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 "Pengaruh Induksi Fruktosa Terhadap Ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 Dan KRAS Pada Sel Kanker Kolorektal WiDr" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Dr. dr Marhaen Hardjo, M.Biomed, Ph.D sebagai Pembimbing Utama dan Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc 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. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Indonesian Biomedical Journal Volume 15, No. 5, October 2023, halaman 304-310, DOI: 10.18585/inabj.v15i5.2534 sebagai artikel dengan judul "Viability, Migration Rate, and mRNA Expression of GLUT5, GLUT7, GLUT11 in WiDr Colorectal Cancer Cell Line".

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

Makassar, 15 November 2023



Nurul Hidayah S. B.
NIM.P062211006

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah Subhanahu Wata'ala, atas kelimpahan berkah dan rahmatnya sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini dengan baik. Atas segala bantuan dan dorongannya, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. dr. Marhaen Hardjo, M. Biomed, Ph.D selaku pembimbing I, dan dr. Dr. dr. Ika Yustisia, M. Sc. selaku pembimbing II, yang telah mencurahkan waktu, tenaga, ilmu, dukungan moril dan materil dalam rangka penyempurnaan penelitian dan penyusunan tesis.
2. Syamsul Bahri dan Aminah Abbas selaku orang tua kami, terima kasih atas segala kesabaran, kasih sayang dan doanya.
3. Harun HS, S.E. selaku suami, terima kasih atas segala doa, cinta, kesabaran, semangat, dan dukungan yang tidak pernah putus.
4. Taufiq Hidayah SB, S.T., Rahmat Hidayah SB., S.Kom., Istiqamah S. Si, dan Muslim Syamsul Bahri, S.T., selaku saudara-saudaraku, terima kasih atas dukungan moril dan materil selama penelitian dan penyusunan tesis.
5. Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Donggala yang telah memfasilitasi dan mengizinkan pelaksanaan studi dan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, selaku penyedia beasiswa dalam rangka studi magister ini.
6. Dosen dan staf Konsentrasi Biokimia dan Biologi Molekuler, Program Studi Ilmu Biomedik, Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
7. Rekan sejawat seperjuangan Konsentrasi Biokimia dan Biologi Molekuler, Program Studi Ilmu Biomedik, Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
8. Semua pihak yang terlibat dalam proses penelitian dan penyusunan tesis ini. Semoga Allah Subhanahu Wata'ala melimpahkan berkah dan rahmatnya untuk kita semua, dan tesis ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan memberikan kontribusi terhadap perkembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, 15 November 2023

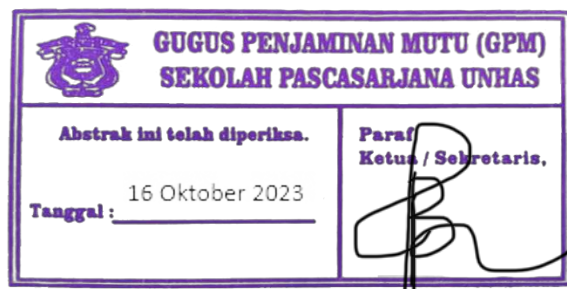
Nurul Hidayah S. B.

ABSTRAK

Nurul Hidayah S. B. *Pengaruh Induksi Fruktosa Terhadap Ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7, GLUT11 Dan KRAS Pada Sel Kanker Kolorektal WiDr.* (dibimbing oleh **Marhaen Hardjo** dan **Ika Yustisia**)

Kadar glukosa yang tidak mencukupi pada pasien kanker kolorektal (CRC) menyebabkan kondisi di mana fruktosa memungkinkan untuk menjadi sumber alternatif sel untuk berproliferasi, namun peran fruktosa atau kombinasi fruktosa-glukosa dalam pengembangan CRC belum diketahui secara jelas. Penelitian bertujuan melihat efek pemberian variasi fruktosa-glukosa terhadap viabilitas, migrasi, dan ekspresi mRNA transporter glukosa (GLUT)5, GLUT7, GLUT11, dan KRAS pada sel kanker kolorektal WiDr. Sel diberi perlakuan pada beberapa variasi konsentrasi (F100%, F75%:G25%, F50%:G50%, F25%:G75%, G100%, F: Fruktosa, G: Glukosa). Sel tanpa perlakuan (F0:G0) sebagai kontrol sel. Uji viabilitas sel menggunakan MTT assay, migrasi sel dengan metode *scratch wound healing assay*, dan qPCR untuk deteksi ekspresi gen. Data dianalisis dengan metode one-way analysis of variance (ANOVA) dilanjutkan dengan uji post-hoc Tukey. Kombinasi fruktosa-glukosa dan glukosa 100% meningkatkan viabilitas sel secara signifikan dibandingkan kontrol ($p < 0,05$). Semua kelompok perlakuan menunjukkan peningkatan migrasi sel yang signifikan dibandingkan kontrol ($p = 0,000$). Hanya ekspresi GLUT7 dan GLUT11 pada kelompok G100% yang berbeda signifikan dibandingkan kontrol ($p = 0,000$). Ekspresi GLUT7 dan GLUT11 juga berbeda nyata pada perlakuan F100% dan F50%:G50% dibandingkan dengan G100% ($p = 0,000$). Perlakuan F100% dan F50%:G50% secara signifikan berpengaruh terhadap ekspresi KRAS dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Secara keseluruhan, fruktosa mungkin memainkan peran penting dalam migrasi sel. Namun dalam hal viabilitas sel, kombinasi dengan glukosa dapat meningkatkan efek fruktosa. Fruktosa mungkin tidak mempengaruhi ekspresi mRNA GLUT5, GLUT7 dan GLUT11 namun berpengaruh terhadap ekspresi mRNA KRAS. Tidak terdapat hubungan antara ekspresi GLUT5, GLUT7, dan GLUT11 terhadap ekspresi KRAS pada sel kanker kolorektal WiDr.

Kata Kunci: GLUT5, GLUT7, GLUT11, KRAS, fruktosa, kanker kolorektal



ABSTRACT

Nurul Hidayah S. B. *Fructose Induction Effect on GLUT5, 7, 11, And KRAS Expressions mRNA in Human Colorectal Cancer WiDr Cell Line.* (supervised by **Marhaen Hardjo dan Ika Yustisia**)

Insufficient glucose levels in colorectal cancer (CRC) patients leads to a condition where fructose might become an alternative source for cell proliferation, but the role of fructose or fructose-glucose combinations in the development of CRC has not been elucidated well. In this study, the effect of fructose-glucose variations on viability, migration, and glucose transporter (GLUT)5, GLUT7, GLUT11, and KRAS mRNA expressions in WiDr CRC cell line were examined. Cells were treated with varying ratios of fructose-glucose (F100%; F75%:G25%; F50%:G50%; F25%:G75%; G100%; F: Fructose, G: Glucose). Untreated cells (F0:G0) were used as cell control. MTT assay was used for cell viability test, scratch assay was used to examine cell migration, and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed to examine mRNA expressions. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and followed with Tukey's post-hoc test. Fructose-glucose combinations and glucose 100% significantly increased the cell viability compared to control ($p < 0.05$). All treatment groups showed a significant increase in cell migration compared to control ($p = 0.000$). Only GLUT7 and GLUT11 expressions in the G100% group were significantly different compared to the control ($p = 0.000$). GLUT7 and GLUT11 expressions were also significantly different in F100% and F50%:G50% treatments compared to G100% ($p = 0.000$). F100% and F50%:G50% treatments significantly affected KRAS expression compared to the control ($p < 0.05$). Taken together, fructose might play an important role in cell migration. However, in cell viability, combination with glucose could increase fructose's effect. Fructose might not affect the mRNA expressions of GLUT5, GLUT7, and GLUT11 but might affect the mRNA expression of KRAS. GLUT5, GLUT7, and GLUT11 expression have no correlation with KRAS expression in WiDr colorectal cancer cells.

Keyword: *GLUT5, GLUT7, GLUT11, KRAS, fructose, colorectal cancer*



DAFTAR ISI

Halaman

UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
.....	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH.....	xiv
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Umum	3
1.3. Tujuan Khusus	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II METODE PENELITIAN	4
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	13
BAB IV KESIMPULAN, KETERBATASAN PENELITIAN, DAN SARAN	23
DAFTAR PUSTAKA	25

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
Tabel 1. Komposisi Medium Kultur Sel	5
Tabel 2. Komposisi Medium Perlakuan.....	7
Tabel 3. Urutan Primer	11

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
Gambar 1. Persentase Viabilitas Sel WiDr pada Berbagai Perlakuan Fruktosa-Glukosa	13
Gambar 2. Penutupan Sel WiDr pada Scratch Wound Healing Assay pada semua waktu pengamatan.....	15
Gambar 3. Persentase Penutupan Sel WiDr pada <i>Scratch Wound Healing Assay</i>	15
Gambar 4. Tingkat Ekspresi GLUT dan KRAS pada Sel CRC WiDr	16
Gambar 5. Tingkat Kejadian dan Kematian Akibat Kanker di Indonesia Tahun 2020	32
Gambar 6. Jalur Metabolik Fruktosa dan Glukosa	35
Gambar 7. Mekanisme Awal Metastasis yang Diinduksi Fruktosa	38
Gambar 8. Konformasi Utama GLUT5.....	40
Gambar 9. Mekanisme Transport Fruktosa yang Difasilitasi GLUT5.....	41

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor Urut	Halaman
Lampiran 1. Tinjauan Pustaka.....	32

DAFTAR ISTILAH

- GLUT** : Glukosa Transporter.
Kelompok protein membran yang memfasilitasi pengangkutan glukosa melalui membran plasma.
- KRAS** : Kirsten Rat Sarcoma Viral
Onkogen dengan tingkat mutasi yang tinggi dan dikaitkan dengan beberapa kanker ganas.
- mRNA** : Messenger RNA.
RNA untai tunggal yang terlibat dalam proses sintesis protein dan terbuat dari cetakan DNA selama proses transkripsi.
- WiDr cell line** : sel kultur yang berasal dari adenocarcinoma kolon pasien dan sering digunakan pada penelitian untuk mempelajari mekanisme kanker kolon.
- l-glutamine** : asam amino yang larut dalam air, dapat meningkatkan absorpsi senyawa kimia lainnya, menstimulasi proliferasi seluler, dan menghambat apoptosis yang disebabkan oleh kerusakan sel.
- FBS** : Fetal Bovine Serum
Bahan alami yang digunakan dalam campuran media untuk kultur in vitro karena mengandung banyak nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel.
- cDNA** : complementary DNA.
RNA rantai ganda yang hanya berisi exon, memiliki sifat yang lebih stabil dari RNA sehingga mudah untuk dianalisis.
- Thawing sel** : proses mencairkan sel yang berasal dari stok beku yang harus dilakukan dengan benar untuk menjaga kelangsungan hidup sel kultur.

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Adaptasi metabolisme yang menyimpang terhadap lingkungan sel merupakan salah satu ciri khas sel kanker dan menjadi penyebab sel normal mengalami perubahan menjadi sel kanker.(1,2) Perubahan metabolisme ini biasa dikenal dengan istilah pemrograman ulang metabolik (*metabolic reprogramming*), merupakan salah satu ciri khas pada kanker kolorektal, sebagai proses adaptif alternatif yang penting untuk menjaga kelangsungan hidup dan proliferasi sel meliputi glikolisis aerob, oksidasi asam lemak, dan *autophagy*.(2–4) Mekanisme tumorigenesis sangat bergantung pada pemrograman ulang metabolisme seluler sebagai konsekuensi langsung dan tidak langsung dari mutasi onkogenik.(3) Fleksibilitas yang tinggi oleh jalur spesifik dapat mengaktifkan pemrograman ulang metabolik dalam memfasilitasi perolehan nutrisi dan metabolisme untuk mendukung pertumbuhan abnormal dan metastasis seperti kebutuhan bioenergi, biosintetik, dan redoks sel.(2,5)

Kanker kolorektal (CRC) merupakan salah satu jenis tumor ganas yang umum ditemukan dan merupakan salah satu kasus kanker tertinggi di seluruh dunia,(6) dan hasil penelitian terbaru menunjukkan bahwa perubahan non-genetik, seperti pemrograman ulang epigenetik dan metabolik, sangat terlibat dalam pengembangan dan perkembangan kanker kolorektal.(7–10)

Fruktosa telah terkonfirmasi dapat menginduksi beberapa komplikasi terkait obesitas yang terkait dengan sindroma metabolik,(11) dimana obesitas dan sindroma metabolik ini berkaitan erat dengan risiko kematian akibat kanker kolorektal.(12,13) Fruktosa dapat dikonsumsi baik dari bahan alami seperti buah dan sayur,(14) maupun dalam bentuk sirup jagung fruktosa tinggi yang banyak ditemukan dalam minuman ringan dan makanan olahan.(11) Fruktosa juga dikaitkan dengan kanker usus besar, pankreas, dan hati.(11)

Metabolisme fruktosa dapat menurunkan regulasi fungsi respirasi mitokondria dan meningkatkan glikolisis aerobik yang dapat membantu metastasis, sehingga fruktosa kerap dikaitkan sebagai sumber energi alternatif untuk sel kanker.(15,16) Kadar glukosa selalu tidak mencukupi dalam jaringan kanker kolorektal manusia, sehingga fruktosa secara fleksibel digunakan oleh sel

tumor sebagai sumber energi alternatif untuk mempertahankan proliferasi dengan meningkatkan regulasi *glucose transporter5* (GLUT5), yang merupakan transporter utama untuk fruktosa.(1) Secara mekanis, di lingkungan yang kekurangan glukosa tetapi kaya fruktosa, GLUT5 dapat berinteraksi dengan ketohexokinase dan menghambat degradasi yang bergantung pada *autophagy*, sehingga fruktosa masuk ke dalam glikolisis dan siklus asam trikarboksilat untuk pertumbuhan ganas sel CRC.(1) Metabolisme fruktosa dapat berlangsung dalam kondisi oksigen rendah, mempercepat pemanfaatan glukosa, dan meningkatkan efek Warburg.(15)

Aktivitas GLUT disesuaikan dengan suplai makanan, komposisi makanan, dan kebutuhan energi dalam berbagai situasi fisiologis dan patofisiologis.(17) GLUT7 terkait erat dengan GLUT5 dengan identitas kemiripan sebesar 53% pada urutan sekuensnya, terutama diekspresikan dalam membran apikal dari epitel usus dan usus besar, dan memiliki afinitas yang tinggi terhadap glukosa dan fruktosa.(18) GLUT11 memiliki kemiripan 42% urutan homologi dengan GLUT5, dan beberapa isoformnya telah teridentifikasi pada manusia, dan juga dapat memfasilitasi transport glukosa maupun fruktosa.(19) Peningkatan regulasi GLUT telah dilaporkan pada berbagai jenis kanker sebagai akibat dari gangguan ekspresi gen atau relokasi atau stabilisasi protein, selain itu GLUT juga memungkinkan untuk mempertahankan permintaan energi yang dibutuhkan oleh sel tumor untuk berbagai program biokimia.(20) Diperlukan glukosa dalam jumlah banyak untuk proliferasi sel kanker, dan proses masuknya glukosa ke dalam sel kanker difasilitasi oleh protein GLUT.(21) GLUT mempertahankan suplai glukosa dan gula terkait lainnya secara konstan untuk aktivitas metabolisme sel dengan mengontrol pengangkutan glukosa antara kompartemen intraseluler dan ekstraseluler.(22) GLUT5 tidak hanya dikaitkan dengan pertumbuhan kanker dan pengeluaran energi tetapi juga dengan migrasi sel kanker yang disebabkan oleh perubahan metabolisme dan perkembangan resistensi obat.(23)

Sebanyak 40% dari kanker kolorektal diketahui memiliki gen *Kirsten sarcoma* (KRAS) yang bermutasi.(24,25) Onkogen KRAS memainkan peran penting dalam mengendalikan metabolisme kanker dengan mengatur berbagai perubahan metabolisme, termasuk regulasi glikolisis aerobik.(26) Hasil penelitian mengemukakan bahwa sel mutan KRAS dalam sel kanker kolorektal secara otonom memberikan perubahan metabolisme seperti efek Warburg melalui

induksi GLUT1,(25) dan belum ditemukan peranan pasti GLUT5, 7, dan 11 sebagai transporter fruktosa dan hubungannya dengan KRAS pada sel kanker kolorektal.

1.2. Tujuan Umum

Mengevaluasi peran fruktosa terhadap pertumbuhan sel kanker kolorektal WiDr melalui aktivitas transporter GLUT5, GLUT7 dan GLUT11.

1.3. Tujuan Khusus

- Membandingkan pertumbuhan sel kanker kolorektal pada beberapa konsentrasi rasio glukosa-fruktosa menggunakan uji MTT.
- Mendeteksi dan menganalisa tingkat ekspresi GLUT5, GLUT7 dan GLUT11 pada sel kanker kolorektal dalam beberapa konsentrasi rasio glukosa-fruktosa.
- Menganalisa pengaruh jumlah pemberian fruktosa terhadap tingkat ekspresi KRAS.
- Menganalisa hubungan antara tingkat ekspresi GLUT5, GLUT7, dan GLUT11 dengan tingkat ekspresi KRAS pada sel kanker kolorektal.

1.4. Manfaat Penelitian

- Manfaat untuk program
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan kepada program pengendalian penyakit tidak menular mengenai salah satu penyebab lain terjadinya karsinogenesis pada saluran cerna, utamanya usus besar (kolon) yaitu konsumsi fruktosa yang berlebihan.
- Manfaat bagi Iptek
Penelitian Ini diharapkan dapat memberikan sumbangan perkembangan ilmu pengetahuan tentang gambaran mengenai peran fruktosa terhadap ketahanan hidup dan pertumbuhan sel kanker kolorektal.
- Manfaat untuk Masyarakat Umum
Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan tentang konsumsi gula yang berlebihan dalam bentuk glukosa dan gula lainnya dapat meningkatkan risiko kanker.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC), Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar dari bulan Februari – Juni 2023.

2.2. Bahan dan Alat

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain DMEM high glucose (Gibco, 11965092); DMEM without glucose, L-Glutamin, phenol red (Gibco, A1443001); Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, F0804); Amphotericin-B (Gibco, 15290018); penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, P4333); Glutamax (Gibco, 35050061); Fruktosa (Sigma-Aldrich, F3510) Glucose solution (Gibco, A2494001); MTT reagent (Sigma–Aldrich); sodium dodecyl sulfate (SDS); TRIzol® (Invitrogen, 15596026); cDNA iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad, 1708890); SensiFAST™ SYBR ® No-ROX Kit (BIO-98020); Primer GLUT5, GLUT7, GLUT11, and β -Actin; tabung sentrifus, flask kultur, plate kultur (plate 6, plate 24, plate 96).

Alat

Peralatan yang digunakan meliputi Bio Safety Cabinet, Inkubator CO₂, mikroskop, mikropipet, vortex, sentrifus, haemocytometer, ELISA reader, spektrofotometer, mesin PCR, elektroforesis,

2.3. Metode Penelitian

Penelitian merupakan penelitian eksperimen dengan kriteria sampel uji sebagai berikut:

Kriteria Inklusi:

- Sel WiDr yang sehat, bertumbuh dan berkembang dengan baik
- Sel tanpa kontaminasi (diamati secara mikroskopis)
- Pertumbuhan sel dengan kepadatan 80% sel/well

Kriteria eksklusi: sel yang mati pada proses kultur, atau terkontaminasi bakteri dan jamur

2.4. Pelaksanaan Penelitian

a. Pembuatan Medium Kultur

Medium kultur (MK) dibuat menggunakan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose* merek *Gibco* (cat:11965-092) dengan penambahan *Fetal Bovin Serum* 10%, antifungi (Amphotericin B 1%) dan antibiotik (Penicilin-Streptomycin 1%) dengan komposisi sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi Medium Kultur Sel

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

b. Kultur Sel

1) *Thawing* Sel

- Stok sel dicairkan di dalam inkubator CO₂ selama kurang lebih 2 menit.
- Sel dituang ke tabung sentrifuge 15 mL berisi 3 mL medium kultur (MK).
- Disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 6 menit.
- Supernatan dibuang, sisakan pelet.
- Suspensi kembali dengan 1 mL MK baru, kemudian dihitung viabilitas dan jumlah sel yang siap ditanam.
- Sel ditanam ke dalam *flask* 25 cm² dengan kepadatan sel 1,0 x 10⁶.
- Ditambahkan 5 mL MK, kemudian dikultur dalam inkubator 37°C yang disuplai 5% CO₂.

- Medium diganti setiap 3-4 hari atau jika terjadi perubahan warna menjadi kekuningan (selama penggantian media kultur, disk dikeluarkan dari inkubator secara cepat agar waktu medium pada suhu ruang lebih sedikit).
- Sel dipanen pada saat pertumbuhannya sudah konfluen 80%.

2) Panen Sel

- Diambil sel dari inkubator CO₂ yang pertumbuhannya konfluen 80%.
- Media dibuang menggunakan pipet steril.
- Sel dicuci dengan 3 mL PBS steril sebanyak dua kali.
- Ditambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator maksimal 3 menit.
- Ditambahkan 5 mL MK untuk menginaktifkan tripsin.
- Resuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu sama lain dan tidak berkoloni.
- Sel yang telah lepas ditransfer ke dalam conical tube untuk kemudian di subkultur.

3) Menghitung Jumlah Sel

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

- MK dibuang dari wadah pertumbuhan, kemudian dicuci dengan PBS steril.
- Ditambahkan tripsin sebanyak 500 μ L untuk melepas sel yang melekat di dasar *flask* (proses ini dilakukan tidak lebih dari 3 menit).
- Ditambahkan MK baru sebanyak 3 mL dan dipindahkan ke tabung 15 mL, disentrifus pada 1000 rpm selama 5 menit.
- Supernatan dibuang, peletnya disuspensikan dengan 1 mL medium baru.
- Dipipet sebanyak 10 μ L ke *microtube* steril dan ditambahkan 10 μ L *trypan blue*, kemudian dihomogenkan.

- Dipipet larutan sebanyak 10 μ L ke *Hemacytometer*
- Jumlah sel hidup yang berada dalam empat bidang hitung (*primer square*) kemudian dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Total sel} = \frac{\text{Jumlah sel (Bidang A+B+C+D)}}{4} \times \text{jumlah dilusi} \times 10^4 \quad (1)$$

4) Sub Kultur Sel

- Dihitung jumlah sel yang akan ditanam.
- Diambil 1 mL sel yang telah dipanen ke dalam *conical tube*
- Ditambahkan 5 mL MK dan resuspensi.
- Sampel dituang ke kultur disk 25, dihomogenkan dan diamati kondisi sel di mikroskop.
- Sel dikultur dalam inkubator 37°C yang disuplai 5% CO₂.
- MK diganti setelah diinkubasi semalaman. Amati keadaan sel sebelum dan setelah penggantian MK.

c. Pengamatan Kultur Sel dengan Medium Fruktosa

- Sebelum diberi perlakuan, terlebih dahulu dibuat medium dengan komposisi sebagai berikut:

Tabel 2. Komposisi Medium Perlakuan

NO	KOMPOSISI	Variasi (mL)					
		A (F 100%)	B (F75% - G25%)	C (F50% - G50%)	D (F25% - G75%)	E (G100%)	F (F0 - G0)
1	DMEM (<i>glucose-free</i>)	83,75	83,75	83,75	83,75	83,75	86
2	Fruktosa (25 mM)	2,25	1,6875	1,125	0,5625	-	-
3	Glukosa (25 mM)	-	0,562	1,125	1,6875	2,25	
4	Glutamax	2	2	2	2	2	2
5	<i>Fetal Bovine Serum</i>	10	10	10	10	10	10

6	Pen-Strep (Penisilin 10.000 unit, Streptomisin 10 mg/mL)	1	1	1	1	1	1
7	Amfotericin B (250 µg/mL)	1	1	1	1	1	

Keterangan:

F = Fruktosa

G = Glukosa

- Diambil sel (kepadatan 2×10^5) yang telah konfluen 80% dan dipindahkan ke masing-masing sumuran 6 *well plate* yang berisi 3 mL MK. Setiap selesai satu *plate*, disuspensi kembali sel agar tetap homogen. Amati kondisi sel di mikroskop.
- Sel dikultur dalam inkubator 37°C yang disuplai 5% CO₂.
- MK diganti setelah diinkubasi semalaman (agar sel pulih kembali setelah panen). Diamati keadaan sel sebelum dan setelah penggantian MK.
- Pada fase logaritmik, MK dibuang dan ditiriskan, dan dimasukkan seri konsentrasi perlakuan (triplo).
- Dilakukan pengamatan pada sel uji kanker kolon WiDr pada 24, 48, 72, dan 96 jam setelah diberi perlakuan. Hasil pengamatan dibandingkan sel kanker kolon WiDr yang ditumbuhkan pada medium glukosa.

d. Uji MTT

- Sel yang telah konfluen 80% dipanen dan dihitung sesuai protokol.
- Dipindahkan sebanyak 100 µl sel ke tiap sumuran 96 *well plate* (kepadatan sel 5×10^3). Resuspensi kembali setiap selesai mengisi 12 sumuran.
- Distribusi dan keadaan sel diamati di mikroskop dan didokumentasikan.
- Sel dikultur dalam inkubator 37°C yang disuplai 5% CO₂ sampai keadaan sel pulih kembali.
- Setelah sel pulih kembali, media pada sumuran dibuang dan ditiriskan dengan cara membalik *plate* 180° diatas wadah pembuangan reagen/medium, kemudian tekan *plate* perlahan diatas tisu.

- Dilakukan pencucian dengan memasukkan 100 μ l PBS steril dalam setiap sumuran, kemudian PBS dibuang dan ditiriskan.
- Ditambahkan 100 μ l media perlakuan, , dengan tiga kali pengulangan.
- Sel dikultur dalam inkubator 37°C yang disuplai 5% CO₂.
- Dilakukan uji pada 24, 48, 72 dan 96 jam setelah diberi perlakuan.
- Media sl dibuang dan dicuci PBS 1x.
- Ditambahkan 100 μ l reagen MTT ke setiap sumuran (kontrol media tidak ditambahkan sel).
- Sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk formazan.
- Diperiksa keadaan sel menggunakan mikroskop inverted. Jika formazan telah terbentuk, ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCL.
- Plate dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi di ruangan gelap (bukan inkubator) pada suhu ruang selama semalaman.
- Absorbansi diukur menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 620 nm.

e. *Scratch Wound Healing Assay*

Metode *scratch assay* dilakukan untuk mengamati laju migrasi sel kanker kolorektal secara *in vitro*.

- Sel WiDr ditumbuhkan pada 24 well plate dengan kepadatan 5x10⁴ sel/well
- Sel diinkubasi pada suhu 37°C yang disuplai 5% CO₂ sampai mencapai minimal 80% konfluensi.
- Dibuat *scratch* pada permukaan dasar sumuran menggunakan ujung pipet tip steril. Diusahakan membuat ukuran *scratch* yang sama untuk sumuran perlakuan dan kontrol.
- Media lama dibuang dan sel dicuci dengan PBS steril sebanyak dua kali.
- Sel kemudian diberikan larutan perlakuan glukosa-fruktosa dan diinkubasi suhu 37°C yang disuplai 5% CO₂,
- Dilakukan pengamatan pada jam ke-0; 18; 24; 42 dan 48 setelah perlakuan. Hasil goresan diamati menggunakan mikroskop inverter

yang sama, pada perbesaran yang sama, dan didokumentasikan menggunakan kamera dan pengaturan yang sama.

- Semua perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali (triplo).
- Hasil *scratch assay* dianalisis menggunakan software ImageJ.
- Migrasi sel dihitung sebagai persentase penutupan (*wound closure percentage*) berdasarkan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Persentase penutupan} = \frac{[(A_{t-0h} - A_{t-\Delta h})/A_{t-0h}]}{(2)} \quad (2)$$

Keterangan:

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

$A_{t-\Delta h}$ =luas area *wound* pada tiap jam pengamatan selanjutnya/akhir pengamatan.

f. Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA sel WiDr dilakukan dari 6 *well plate* setelah 72 jam perlakuan variasi konsentrasi medium fruktosa-glukosa. Ekstraksi menggunakan reagen Trizol dengan protokol sebagai berikut:

- Media pada sumuran dibuang dan ditiriskan.
- Sumuran dicuci dengan PBS steril sebanyak 2x, kemudian dilakukan penambahan Trizol sebanyak 1mL.
- Sampel dimasukkan ke *tube* 15 mL, 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 di bagian bawah, bagian tengah dan bagian atas yang tidak berwarna).
- Suspensi yang tidak berwarna dipipet dan dipindahkan ke *tube* baru.
- Ditambahkan isopropanol sebanyak 0,5 mL kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 4°C.
- Disentrifus selama 10 menit pada 12000 *g*, suhu 4°C, kemudian supernatan dibuang.

- Ditambahkan 1 mL etanol 75% pada pelet, divortex selama beberapa detik, kemudian disentrifus 7500 g pada suhu 4°C selama 5 menit. Tube dikeringanginkan selama 5-10 menit (jangan sampai pelet menjadi kering).
- Ditambahkan 30µL *RNAse free water*, kemudian dihomogenkan.
- Dilakukan pembacaan konsentrasi RNA menggunakan spektrofotometer.

g. Ekspresi GLUT dan KRAS

Ekspresi GLUT (5,7,11), dan onkogen KRAS dianalisis dengan *qRT-PCR* menggunakan PCR kit 2x SensiFAST™ SYBR®. β -actin sebagai internal kontrol. Primer yang digunakan adalah primer gen SLC2A5, SLC2A7, SLC2A11, KRAS, yang diperoleh dari PT. Genetika Science Indonesia (Tangerang, Indonesia), dengan urutan primer sebagai berikut:

Tabel 3. Urutan Primer

Gen	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	bp
GLUT5	CCTTTGGGTCATCCTTCCA	ACAGACCACAGCAACGTCAA	145
GLUT7	TCGGTGCCTACAGTTTCATC	AATGCGGTTTATCTCCACAA	113
GLUT11	CGTGATGGGACAGGTGGT	GCTTTCAGGGAGCAGAGG	127
KRAS	TAGTCACATTTTCATTATTTTAT	AGATTTACCTCTATTGTTGGAT	160

- Dilakukan penyetaraan konsentrasi RNA untuk semua sampel yang akan diuji.
- Sampel RNA disintesis menjadi cDNA menggunakan enzim iScript™ cDNA Synthesis Kit. Proses sintesis cDNA menggunakan PCR konvensional.
- Disiapkan *Reaction mix* dengan menghitung jumlah sampel yang akan dikerjakan ditambah dengan kontrol negatif, dan kontrol positif.
- 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 (cDNA), kontrol negatif dan kontrol positif sesuai dengan peta *plate* PCR

sehingga total volume sampel setiap *well* sebanyak 20 μ l.

- *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 dan diampilifikasi dengan profil sebagai berikut: 15 menit (95°C), 40 siklus selama 30 detik (94°C), 30 detik (53°C) dan 30 detik (72°C).

h. Analisis Data

Hasil pengamatan dianalisis secara statistik dengan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) menggunakan perangkat lunak SPSS. Visualisasi hasil berupa nilai rata-rata \pm SD menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism.

2.5. Parameter Pengamatan

Viabilitas sel ditentukan berdasarkan nilai absorbansi dari hasil pembacaan ELISA reader, *wound healing* berdasarkan persentase penutupan sel pada berbagai perlakuan, dan ekspresi gen berdasarkan nilai CT.