

LAPORAN AKHIR
PENELITIAN ILMU KEDOKTERAN



**PENGARUH LAMA INKUBASI DENGAN PERLAKUAN
GLUKOTOKSISITAS TERHADAP VIABILITAS SEL IGL
KULTUR 2D**

Oleh;

dr. Dewi Jantika Djuarna, Sp. PA (8876999974)

Dr. dr. Irena Ujjanti, M. Biomed (0310108104)

Zury Discha Syamsudin (1910015017)

Nomor Kontrak Penelitian:

Dana Penelitian: Rp. 8.000.000

FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF DR HAMKA
JAKARTA
TAHUN

**SPK PENELITIAN YANG SUDAH DI TANDA TANGANI OLEH
PENELITI, KETUA LEMLITBANG, DAN WAKIL REKTOR II**

**LAPORAN PENELITIAN****UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF DR. HAMKA Tahun 202X**

Judul : Pengaruh Lama Inkubasi dengan Perlakuan Glukotoksisitas terhadap Viabilitas Sel iGL Klutur 2D

Ketua Peneliti : dr. Dewi Jantika Djuarna, Sp.PA

Skema Hibah : Penelitian pengembangan ilmu kedokteran

Fakultas : Fakultas Kedokteran

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter

Luaran Wajib

No	Judul	Nama Jurnal/ Penerbit/ Prosiding	Level SCIMAGO/ SINTA	Progress Luaran
1	Pengaruh Lama Inkubasi dengan Perlakuan Glukotoksisitas terhadap Viabilitas Sel iGL Klutur 2D		Sinta 2	

Luaran Tambahan

No	Judul	Nama Jurnal/ Penerbit/ Prosiding	Level SCIMAGO/ SINTA	Progress Luaran
1	Pengaruh Lama Inkubasi dengan Perlakuan Glukotoksisitas terhadap Viabilitas Sel iGL Klutur 2D			

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Ketua Peneliti

Click or tap here to enter text.
NIDN. Click or tap here to enter text.

Click or tap here to enter text.
NIDN. Click or tap here to enter text.

Menyetujui,
Dekan Choose an item.

Ketua Lemlitbang UHAMKA

Click or tap here to enter text.
NIDN. Click or tap here to enter text.

Dr. apt. Supandi, M.Si
NIDN. 0319067801

LAPORAN AKHIR**Pengaruh Lama Inkubasi dengan Perlakuan Glukotoksisitas terhadap Viabilitas Sel iGL Klutur 2D****Latar Belakang (Background)**

Glukotoksisitas merupakan kondisi tubuh mengalami kadar gula darah yang berlebih dalam kurun waktu yang lama sehingga mengakibatkan disfungsi insulin. Glukotoksisitas kerap kali dialami oleh penderita diabetes melitus (DM) (Robertson, Harmon, & dkk, 2003).

Diabetes melitus merupakan salah satu dari penyakit metabolik yang ditandai dengan kadar gula darah yang tinggi. Gejala khas dari diabetes melitus adalah poliuria, polidipsia dan juga polifagia. Diabetes melitus dapat disebabkan oleh pankreas yang tidak dapat memproduksi insulin yang cukup maupun sel yang ada di dalam tubuh tidak dapat merespon insulin dengan baik (Okur, Karantas, & Siafaka, 2017).

Diabetes melitus yang sudah kronis dapat menyebabkan glukotoksisitas yang dapat dilihat pada mekanisme sekresi insulin di sel β -pankreas. Hal tersebut dapat dilihat pada sel Insulin Gaussia Luciferase (iGL). (Suzuki, Kanamori, & Inouye, 2017) melakukan penelitian dengan metode in vitro yaitu dengan mengkultur sel iGL yang merupakan subkultur dari sel β -pankreas tikus dan dimodifikasi menyerupai sel β -pankreas manusia. iGL memiliki kelebihan yaitu mengontrol kadar gula darah dengan merespon lingkungan sekitar dengan cara mensekresikan insulin ketika mendeteksi tingginya kadar gula darah. Sel iGL tersebut dapat dikultur dengan sistem 2D maupun 3D. Dengan adanya kultur tersebut maka peneliti dapat melihat bagaimana viabilitas maupun pertumbuhan sel iGL secara mikroskopik (Suzuki, Kanamori, & Inouye, 2017).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Ningsih dkk (Ningsih, Avissa, & dkk, 2021) mendapatkan viabilitas sel iGL lebih efektif menggunakan kultur 2D dibandingkan kultur 3D. Hasil dari penelitian tersebut adalah >80% sel iGL yang dilakukan kultur 2D mampu mempertahankan viabilitasnya untuk semua variasi konsentrasi sel hingga hari keempat. Melainkan pada kultur 3D yang membentuk sferoid, viabilitas sel iGL mulai turun secara signifikan dimulai dari hari ketiga hingga hari keempat.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka peneliti tertarik mengidentifikasi viabilitas sel iGL yang mengalami glukotoksisitas dalam masa waktu inkubasi pada kultur 2D. Penelitian ini bertujuan untuk melihat bagaimana mekanisme

yang terjadi pada sel iGL yang mengalami glukotoksisitas dan diharapkan dapat menjadi referensi terapi diabetes meitius pada penelitian yang akan datang.

Tujuan Riset (Objective)

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui viabilitas sel iGL yang diberikan perlakuan glukotoksisitas pada kultur 2D dalam jangka waktu 3 dan 7 hari.

Metodologi (Method)

Jenis penelitian yang telah dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan desain penelitian analisis eksperimental secara in vitro. Sampel yang digunakan pada penelitian ini ialah sel iGL yang akan dikultur dengan medium yang telah diberikan glukosa dengan konsentrasi 100 sel/ μ L yang dikultur secara 2D. Setelah itu sel yang telah dikultur diberikan perlakuan. Lokasi penelitian yang berada di Laboratorium Preparasi dan Penelitian FK UHAMKA pada bulan Oktober 2022 – Mei 2023.

Teknik pengumpulan data yang dilakukan oleh peneliti pada penelitian kali ini adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan Medium Kultur Sel iGL

Tahapan yang pertama dalam pengumpulan data adalah dengan cara membuat medium yang akan digunakan pada saat kultur sel iGL. Medium basal yang akan peneliti gunakan adalah RPMI1640 yang memiliki kandungan : L-glutamine, HEPES, sodium pyruvate, glucose, dan sodium bicarbonate dan ditambahkan zat aditif berupa : Fetal Bovine serum 5%, Asam Piruvat 1mM, monothioglycerol 500 μ M, serta G-418 200 μ g/mL.

2. Thawing Cell

Tahapan yang kedua adalah thawing sel. Langkah pertama adalah memindahkan tabung cryovial yang berisikan sel yang telah diinkubasi dengan suhu -80°C ke waterbath dengan suhu 37°C . Lalu memindahkan suspensi sel ke dalam tabung sentrifuge dengan ukuran 50 mL yang telah berisikan 9 mL medium kultur. Lalu setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 300 X g selama 5 menit. Setelah itu buang supernatan dan resuspensi kembali dengan 10 mL medium. Setelah itu pindahkan suspensi sel ke dalam 100 mm pada jumlah sel 8×10^5 sel/petri dan inkubasi sel

dalam inkubator 37°C dan kandungan udara sebanyak 5% CO₂ . Setelah mencapai konfluensi 70-90%, dilakukan subkultur untuk perbanyakkan sel.

3. Subkultur Sel

Sel yang sedang diinkubasi dikeluarkan dari inkubator, lalu dibilas menggunakan larutan dengan PBS (Phosphate buffer saline) sebanyak 10 mL dengan ditambahkan 1 mL larutan trypsin-EDTA 0,05%. Langkah selanjutnya yaitu menginkubasi di inkubator selama 2 menit. Kemudian media iGL sebanyak 10 ml ditambahkan ke dalam sel dan dipindahkan ke tabung sel. Lalu lakukan sentrifugasi 300 x g 5 menit dengan suhu 4°C. Setelah itu keluarkan supernatan dan masukkan pellet sel kedalam 1 ml medium yang baru. Lalu lakukan pengamatan dengan melihat hidup sel hidup serta dihitung dengan Luna Automated Cell Counter II. Setelah itu Sel-sel di-plating dalam cawan Petri 100 mm dengan jumlah sel 1-2 x 10⁶ sel/Petri lalu diinkubasi pada suhu 37°C pada kondisi udara sebanyak 5% CO₂. Pergantian medium dilakukan selama 3-4 hari setelah *seeding*.

4. Perlakuan

Perlakuan yang akan diberikan kepada sel iGL adalah dengan cara menambahkan kadar konsentrasi glukosa pada medium yang akan digunakan pada sel iGL. Konsentrasi glukosa yang akan ditambahkan ke medium terdiri dari empat konsentrasi antara lain 11, 16.5, 22, 33, dan 44 mM yang dilarutkan dalam aquades yang telah dihitung melalui rumus molaritas larutan yang akan ditambahkan pada medium RPMI 1640 dalam rentan waktu inkubasi selama 7 hari.

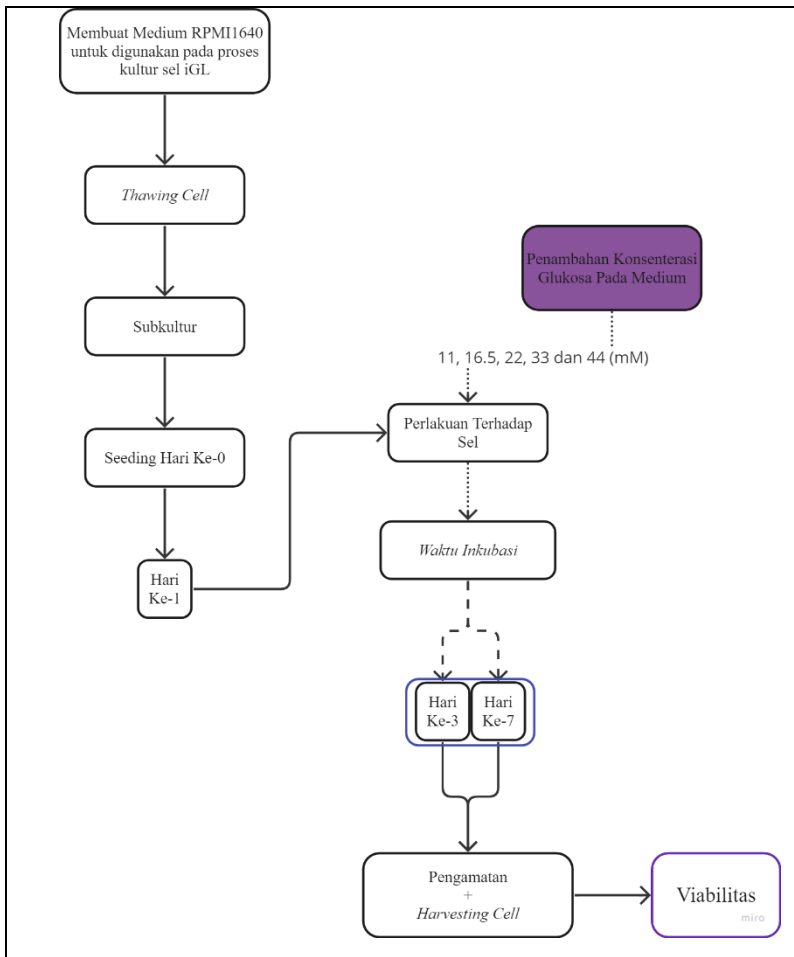
5. Panen atau Harvesting

Setelah melakukan perlakuan berupa penambahan glukosa pada medium langkah selanjutnya adalah panen atau harvesting. Dengan menggunakan 200 µL larutan trypsin-EDTA 0,05% selama 1-2 menit, setelah itu sel bisa ditambahkan dengan 2 mL medium iGL serta dipindahkan ke dalam tabung 15 mL. Setelah dipindahkan lakukan sentrifugasi dalam kurun waktu 5 menit dengan suhu 4°C. Setelah sentrifugasi buanglah Supernatan, dan masukkan 1 ml medium baru ke dalam endapan.

6. Pengukuran Viabilitas Sel iGL dengan menggunakan Trypan Blue

Sel yang dipanen akan dihitung berapa banyak jumlah sel dan viabilitasnya dengan menggunakan Luna Counting Cell dengan mencampurkan suspensi sel dan trypan blue dengan perbandingan 1:1. Panen akan dilakukan pada hari ke-3, dan 7. (Steven et al., 1993). Persentase sel yang hidup dan sel yang mati menggunakan rumus: (Bahi, Jacob, & Khairan, 109-114)

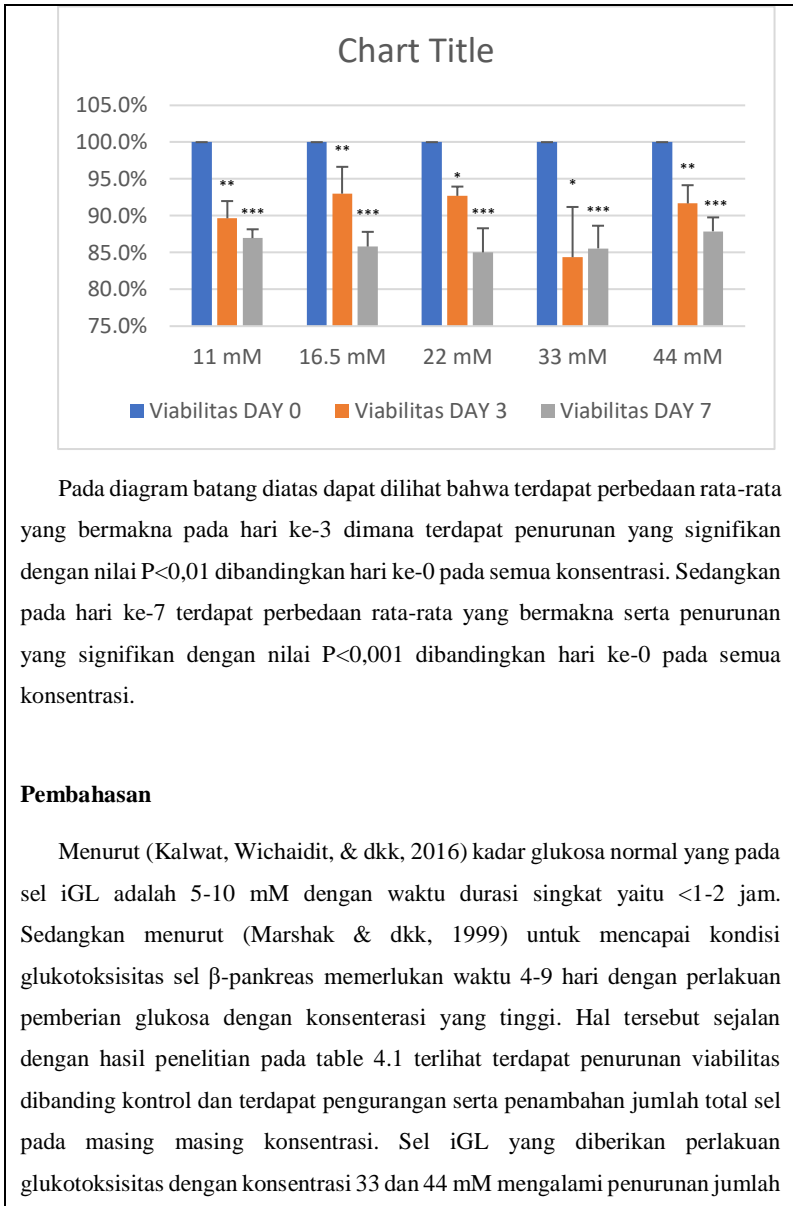
$$\text{Viable cell} = \frac{\text{total number of viable cells / ml of aliquot}}{\text{total number of cell/ml of aliquot}} \times 100\%$$



Hasil dan pembahasan

Hasil

Hasil viabilitas yang didapatkan pada setiap perlakuan kemudian diujikan menggunakan aplikasi SPSS untuk melihat perbedaan rata-rata pada viabilitas sel menurut harinya berdasarkan konsentrasi. Berikut hasil yang didapatkan oleh peneliti :



total sel pada hari ke-3 dan meningkat pada hari ke-7 merupakan salah satu dari proses adaptif sel. Menurut (Wortham & Sander, 2016) dalam penelitiannya bahwa hiperglikemi berkepanjangan dapat menyebabkan resistensi insulin, hal tersebut terjadi dikarenakan sel β -pankreas yang secara terus menerus mensekresikan insulin untuk mengurangi konsentrasi glukosa dalam darah. Kebutuhan insulin yang semakin tinggi harus dipenuhi dengan peningkatan pelepasan insulin oleh sel β -pankreas. Mekanisme adaptif yang terjadi menyebabkan respon sekresi insulin terhadap glukosa menjadi lebih sensitif.

Peningkatan jumlah sel yang terjadi pada table 4.1 didukung oleh penelitian yang telah dilakukan oleh Alexandrine Liboz (Liboz & dkk, 2023) pada penelitiannya dikatakan bahwa mekanisme adaptif pada sel β -pankreas dapat terjadi pada kondisi tubuh yang mengalami kadar glukosa yang tinggi di dalam darah. Pada penelitian tersebut didapatkan hasil bahwa terdapat peningkatan jumlah sel β -pankreas yang signifikan serta didapatkan sel β -pankreas yang meningkat dengan berlipat ganda setelah resistensi insulin yang diakibatkan oleh tingginya kadar glukosa yang terjadi dalam durasi yang lama. Pada analisis yang didapatkan yaitu populasi sel β -pankreas menunjukkan peningkatan pada kelompok sel beta kecil dan besar, dengan demikian membuktikan bahwa terjadi neogenesis pada sel β -pankreas, dan proliferasi sel β -pankreas dan membuktikan bahwa terdapat mekanisme adaptasi pada sel β -pankreas

Sedangkan sel yang mengalami penurunan jumlah sel diakibatkan oleh rekasi stres oksidatif akibat kondisi hiperglikemi. Pada gambar 4.1 terlihat bahwa sel yang diberikan perlakuan pada tiap konsentrasi memiliki perbedaan rata-rata yang bermakna pada hari ke-3 dan ke-7. Penurunan viabilitas yang ada pada sel iGL menandakan bahwa terdapat penurunan fungsional pada sel iGL. Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Mandrup-Poulsen, 1999) sel β -pankreas dapat mengalami apoptosis dikarenakan induksi glukosa berlebih dalam jangka waktu tertentu sehingga menimbulkan kondisi kornis dan

mengakibatkan glukotoksisitas. Hiperglikemi yang berlebih dapat menyebabkan reaksi oksidatif stress dan memicu sel β -pankreas bekerja lebih sehingga harus mengeluarkan insulin lebih dari biasanya.

Menurut (Costes, Bertand, & Ravier, 2021) kondisi hiperglikemi yang berkepanjangan dapat memicu reaks stress oksidatif dimana terdapat reaksi metabolic yang terjadi secara terus menerus dan menghasilkan Reactive Oxygen Species (ROS) yang terdiri dari superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-), radikal peroksil (ROO^-). Senyawa radikal yang terbentuk dari ROS memicu human- islet amyloid polypeptide (h- IAPP) untuk masuk ke dalam sel β -pankreas melalui signal-regulating kinase 1 (ASK1) hal tersebut memicu c-Jun N- Terminak Kinase (JNK) mangaktifkan mekanisme apoptosis pada sel β -pankreas. Menurut (Oh & dkk, 2015) durasi hiperglikemia sangat mempengaruhi viabilitas dari sel β -pankreas dimana hiperglikemia berkepanjangan dapat menyebabkan efek proapoptosis yang dapat dibuktikan dengan penurunan sistensi insulisin yang menyebabkan menurunnya ekspresi gen insulin.

Daftar Pustaka (Voncoover)

1. Andiana, M., Rachmawati, Y., & Andayani, S. S. (2017). Kultur Sel Baby Hamster Kidney (BHK) Menggunakan Media Dulbecco's Modified Eagle Medium (D MEM). *Biotropic The Journal of Tropical Biology*, 10-17.
2. Antarianto, R. D., Septiana, W. L., & dkk. (2017). Perbandingan Ko-kultur 2D dan 3D dengan Metode Hanging Drop untuk Menghasilkan Micro-environment yang Lebih Relevan Secara Klinis. *eJKI*, 121-126.
3. Bahi, M., Jacob, C., & Khairan, K. (109-114). EFEK SITOTOKSIK HAARLEM OIL TERHADAP HL-60 CELL LINE DAN *Steinernema feltiae*. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 2016.
4. Banday, M., Sameer, A., & Nissar, S. (2020). Pathophysiology of Diabetes: An Overview. *Avicenna Journal of Medicine*, 10, 174-88. doi:10.4103/ajm.ajm_53_20

5. Costes, S., Bertand, G., & Ravier, M. (2021). Mechanisms of Beta-Cell Apoptosis in Type 2 Diabetes-Prone Situations and Potential Protection by GLP-1-Based Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-23.
6. Hardianti, D. (2020). TELAAH KOMPREHENSIF DIABETES MELITUS:KLASIFIKASI, GEJALA, DIAGNOSIS, PENCEGAHAN, DAN PENGOBATAN. *JURNAL BIOTEKNOLOGI & BIOSAINS INDONESIA*, 304-317.
7. Kalwat, M. A., Wichaidit, C., & dkk. (2016). Insulin Promoter-driven Gaussia Luciferase-based Insulin Secretion Biosensor Assay for Discovery of β -cell Glucose-sensing Pathways. *National Library of Medicine*, 1208-1212.
8. Kawahito, S. (2009). Problems Associated with Glucose Toxicity: Role of Hyperglycemia-Induced Oxidative Stress. *World Journal of Gastroenterology*, 4137-4142.
9. Liboz, A., & dkk. (2023). Insulin resistance-driven beta-cell adaptation in mice: Mechanistic characterization and 3D analysis. Paris: Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA).
10. Mandrup-Poulsen, T. (1999). Beta Cell Apoptosis Stimuli and Signaling. *Diabetes*, 58-63.
11. Marshak, S., & dkk. (1999). Impaired b-Cell Functions Induced by Chronic Exposure of Cultured Human Pancreatic Islets to High Glucose. *Diabetes*, 1230-1236.
12. Nasution, F., Andidala, & Siregar, A. A. (2021, Mei). Faktor Risiko Kejadian Diabetes Mellitus. *Jurnal Ilmu Kesehatan*, 9, 94-102. Retrieved from <https://ejournaladhdkr.com/index.php/jik/article/view/304/212>
13. Ningsih, S. S., Avissa, R., & dkk. (2021). Evaluation of morphology and viability of spheroid derived from Insulin-GLase cell line: A model system to understand Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 211-215.
14. Nurvita, S. (2022). Perbandingan Kasus Baru dan Lama Diabetes Mellitus Tipe II Di Puskesmas Bangetayu Tahun 2016-2021. *Jurnal Kesehatan Ilmiah Indonesia*, 1-4.

15. Oh, Y. S., & dkk. (2015). Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids. *Anatomy and Cell Biology*, 16-24.
16. Okur, M. E., Karantas, I., & Sifaka, P. (2017). Diabetes Mellitus: A Review on Pathophysiologi, Currnet Status of Oral Medication and Future. *Acta Pharmaceutica Scientia* , 55, 61-82. doi: 10.23893/1307-2080.APS.0555
17. Robertson, R. P., Harmon, J., & dkk. (2003). Glucose Toxicity in Beta Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection. *Diabetes*, 581-587.
18. Segeritz, C.-P., & Vllier, L. (2016). *Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro*. Cambridge: Elsevier.
19. Suzuki, T., Kanamori, T., & Inouye, S. (2017). *Quantitative Visualization of Synchronized Insulin Secretion from 3D-Cultured Cell*. Elsevier, 886-892.
20. Wortham, M., & Sander, M. (2016). *Mechanisms of β -cell functional adaptation to changes in workload*. WILEY, 78-86

Target Jurnal Internasional (Output)

Sinta 2

Lampiran Log Book

No	Tanggal	Kegiatan
1	26 Januari 2023	Thawing Sel
2	04 Februari – 15 Maret 2023	Subkultur Sel
3	15 – 23 Maret 2023	Perlakuan Gluktoksisitas
4	17 Maret 2023	Pengamatan Viabilitas pada perlakuan hari ke-3
5	23 Maret 2023	Pengamatan Viabilitas pada perlakuan hari ke-3

Lampiran LuaranWajib**Lampiran Luaran Tambahan****Bukti Indexed**