

**ANALISIS KONSENTRASI PENGGUNAAN JC-1 DALAM
PENILAIAN AKTIVITAS MITOKONDRIA PADA
PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)**

SKRIPSI



OLEH:

SYAKIRAH RIHHADATUL' AISY

2108260087

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

MEDAN

2025

**ANALISIS KONSENTRASI PENGGUNAAN JC-1 DALAM
PENILAIAN AKTIVITAS MITOKONDRIA PADA
PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)**

**Skripsi ini diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Kelulusan Sarjana Dokter**



Oleh:

SYAKIRAH RIHHADATUL' AISY

2108260087

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
MEDAN
2025**

HALAMAN PERSETUJUAN



MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN & PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162 Ext.
20 Fax. (061) 7363488
Website : fk@umsu.ac.id



LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Nama : Syakirah Rihhadatul'aisy
NPM : 2108260087
Prodi/Bagian : Pendidikan Dokter
Judul Skripsi : Analisis Konsentrasi Penggunaan JC-1 dalam Penilaian Aktivitas Mitokondria pada PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

Disetujui untuk disampaikan kepada panitia ujian

Medan, 20 Juni 2025

Pembimbing,

(dr. Zukhrofi Muzar, M.Si.Med., M.Sc., Ph.D)
NIDN:0128068602

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua baik sumber yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Syakirah Rihhadatul'aisy

NPM : 2108260087

Judul Skripsi : **ANALISIS KONSENTRASI PENGGUNAAN
JC-1 DALAM PENILAIAN AKTIVITAS
MITOKONDRIA PADA PBMC (*PERIPHERAL
BLOOD MONONUCLEAR CELL*)**

Demikianlah pernyataan ini saya perbuat, untuk dapat dipergunakan sebagaimana semestinya.

Medan, 30 Juni 2025



Syakirah Rihhadatul'aisy



MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN & PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162 Ext.
20 Fax. (061) 7363488
Website : fk@umsu.ac.id



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Syakirah Rihhadatul'aisy

NPM : 2108260087

Judul : Analisis Konsentrasi Penggunaan JC-1 dalam Penilaian Aktivitas Mitokondria pada PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing,

(dr. Zulkhrofi Muzar, M.Si.Med., M.Sc., Ph.D)

NIDN: 0128068602

Penguji 1

(Dr. Yulia Fauziah, M.Sc)

NIDN: 0423078703

Penguji 2

(Assoc. Prof. Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M.Ked (PA), Sp.PA)

NIDN: 0115077401

Mengetahui,



Dekan FK UMSU

(dr. Siti Maslina Siregar, Sp. THT-KL (K))

NIDN: 0106098201

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter FK UMSU

(dr. Desi Isnayanti, M.Pd.Ked)

NIDN: 0112098605

Ditetapkan di : Medan
Tanggal : 15 Juli 2025

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena rahmat dan hidayah-Nya lah saya dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Penggunaan Konsentrasi JC-1 dalam Penilaian Aktivitas Mitokondria pada PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)”. Selawat dan salam selalu kita curahkan kepada junjungan alam Nabi Muhammad SAW, yang telah membawa kita dari zaman jahilliyah menuju zaman yang penuh dengan pengetahuan.

Dalam penyusunan skripsi ini saya memiliki banyak kekurangan dan hambatan, namun berkat bantuan, bimbingan, dan kerja sama yang ikhlas dari berbagai pihak akhirnya skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Pada kesempatan ini pula saya selaku penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Siti Masliana Siregar, Sp.T.H.T.B.K.L., Subsp. Rinologi (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
2. dr. Desi Isnayanti, M.Pd.Ked. selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
3. dr. Rahmanita Sinaga, M.Ked (OG), Sp.OG selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, serta dukungan kepada penulis selama menjalankan masa pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
4. dr. Zukhrofi Muzar, M.Si.Med., M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing saya yang telah memberi banyak bimbingan, arahan, saran, dan masukan, serta dorongan dalam penulisan skripsi ini. Atas bimbingan beliau saya dapat mengerjakan skripsi dan penelitian dengan baik.
5. Dr. Yulia Fauziyah, M.Sc. selaku dosen penguji satu saya yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan kepada penulis dalam penulisan skripsi ini.

6. Assoc. Prof. Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M.Ked (PA), Sp.PA selaku dosen penguji dua saya yang telah memberikan saran dan masukan kepada penulis dalam penulisan skripsi ini.
7. Seluruh staf dosen FK UMSU yang telah mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis selama pendidikan.
8. Ayahanda Bunyan Armansyah dan Ibunda Ernita serta Kakanda Rizky Athiyyah Ekayansyah yang selalu memberikan semangat dan dukungan penuh pada penulis selama pendidikan hingga proses penyelesaian tugas akhir ini.
9. Teman – teman saya Syafrida, Salsa, Nabila, Cici, Nurmalinda, Nadin, Azizi, Luthfi, Dzaky, Azra, dan lainnya yang telah memberi dukungan dalam penyelesaian skripsi ini serta kebaikannya selama masa pendidikan dan rekan – rekan sejawat FK UMSU Angkatan 2021 atas segala bantuan dan kerja samanya.
10. Rekan – rekan saya di TBM FK UMSU yang telah memberi dukungan dan semangat dalam penulisan skripsi ini.
11. Dan berbagai pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, penulis mengucapkan terima kasih atas setiap doa dan bantuan yang telah diberikan. Semoga Allah SWT berkenan membalas semua kebaikan.

Demikian skripsi ini dibuat. Penulis menyadari bahwa tidak menutup kemungkinan masih adanya kekurangan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga amal baik semua pihak mendapatkan balasan yang berlipat ganda dari Sang Pencipta, Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Medan, 20 Juni 2025



Syakirah Rihhadatul'aisy

**PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, saya yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Syakirah Rihhadatul'aisy
NPM : 2108260087
Fakultas : Kedokteran

dalam pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas skripsi saya yang berjudul "**Analisis Konsentrasi Penggunaan JC-1 dalam Penilaian Aktivitas Mitokondria pada PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)**" beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalih media/memformatkan, mengelola dalam bentuk *database*, merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Di buat di : Medan
Pada Tanggal : 16 Agustus 2025

Yang Menyatakan,



Syakirah Rihhadatul'aisy

ABSTRAK

Latar Belakang: Mitokondria merupakan organel penting yang berperan dalam produksi energi sel melalui proses fosforilasi oksidatif. Salah satu indikator fungsi mitokondria adalah potensi membran mitokondria, yang dapat dinilai menggunakan pewarna fluoresens JC-1. Sebagian besar penelitian menggunakan konsentrasi JC-1 sebesar 2 μ M, namun efektivitas konsentrasi lain seperti 4 μ M masih belum banyak dikaji, terutama pada sel PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*). Tujuan penelitian ini untuk menganalisis pengaruh penggunaan dua konsentrasi JC-1 (2 μ M dan 4 μ M) terhadap aktivitas mitokondria pada PBMC.

Metode: Penelitian ini merupakan analitik eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan menggunakan sampel darah dari donor sehat. Sel PBMC diisolasi, dikultur, lalu diberi perlakuan JC-1 dengan dua konsentrasi berbeda. Penilaian dilakukan dengan mikroskop fluoresens untuk menghitung jumlah sel yang menyerap warna merah sebagai indikator potensi membran mitokondria.

Hasil: Sel yang menyerap warna merah pada konsentrasi 2 μ M memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan 4 μ M (mean 49,00 vs 34,00), meskipun perbedaan tidak signifikan secara statistik ($p=0,196$). Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi 2 μ M cenderung lebih efektif dalam menilai potensi membran mitokondria pada PBMC. **Kesimpulan:** Konsentrasi JC-1 sebesar 2 μ M merupakan konsentrasi yang optimal dalam menilai potensi membran mitokondria pada PBMC.

Kata Kunci: JC-1, mitokondria, PBMC, konsentrasi JC-1

ABSTRACT

Background: Mitochondria are essential organelles responsible for cellular energy production through oxidative phosphorylation. One indicator of mitochondrial function is the mitochondrial membrane potential, which can be assessed using the fluorescent dye JC-1. Most studies use a JC-1 concentration of 2 μ M, but the effectiveness of other concentrations, such as 4 μ M, has not been widely investigated, particularly in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). This study aimed to analyze the effect of two JC-1 concentrations (2 μ M and 4 μ M) on mitochondrial activity in PBMCs. **Methods:** This was an analytical experimental study conducted in a laboratory setting using blood samples from healthy donors. PBMCs were isolated, cultured, and treated with JC-1 at two different concentrations. Assessment was performed using a fluorescence microscope to count the number of cells exhibiting red fluorescence, indicating mitochondrial membrane potential. **Results:** Cells treated with 2 μ M JC-1 exhibited a higher number of red-fluorescent cells compared to those treated with 4 μ M (mean 49.00 vs. 34.00), although the difference was not statistically significant ($p = 0.196$). These results suggest that 2 μ M tends to be more effective in assessing mitochondrial membrane potential in PBMCs. **Conclusion:** A JC-1 concentration of 2 μ M appears to be optimal for evaluating mitochondrial membrane potential in PBMCs.

Keywords: JC-1, mitochondria, PBMC, JC-1 concentration

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.3.1 Tujuan Umum.....	2
1.3.2 Tujuan Khusus.....	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 PBMC.....	4
2.1.1 Definisi	4
2.1.2 Faktor yang Mempengaruhi PBMC	4
2.2 Mitokondria.....	5
2.2.1 Morfologi Mitokondria	5
2.2.2 Peran Mitokondria.....	6
2.2.3 Kondisi Mitokondria Berfungsi dan Disfungsi	7
2.2.4 Potensi Membran Mitokondria.....	9
2.3 Pewarnaan Mitokondria	10

2.3.1	Definisi	10
2.3.2	Jenis – Jenis Pewarnaan pada Mitokondria.....	11
2.4	JC-1	11
2.4.1	Definisi	11
2.4.2	Faktor yang Mempengaruhi JC-1	12
2.5	Kerangka Teori	14
2.6	Kerangka Konsep	14
2.7	Hipotesis.....	15
BAB 3. METODE PENELITIAN		16
3.1	Definisi Operasional.....	16
3.2	Jenis Penelitian.....	17
3.3	Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.4	Populasi dan Sampel Penelitian	17
3.4.1	Populasi Penelitian	17
3.4.2	Sampel Penelitian	17
3.5	Teknik Pengumpulan Data	18
3.5.1	Alat Penelitian	18
3.5.2	Bahan Penelitian.....	18
3.5.3	Seleksi Sampel	19
3.5.4	Pengambilan Sampel Darah	19
3.5.5	Isolasi PBMC	19
3.5.6	<i>Thawing</i> dan Perhitungan Sel pada PBMC	20
3.5.7	Kultur PBMC	21
3.5.8	Perhitungan Konsentrasi JC-1	21
3.5.9	Pewarnaan Mitokondria Menggunakan JC-1	22
3.6	Pengolahan dan Analisis Data	22
3.6.1	Pengolahan Data.....	22
3.6.2	Analisis Data	22
3.7	Alur Penelitian	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		24
4.1	Hasil Penelitian	24

4.1.1	Isolasi PBMC	24
4.1.2	Perhitungan Sel	24
4.1.3	Kultur PBMC	25
4.1.4	Perhitungan Konsentrasi JC-1	25
4.1.5	Pewarnaan Mitokondria Menggunakan JC-1	26
4.1.6	Analisis Data	27
4.2	Pembahasan.....	28
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....		30
5.1	Kesimpulan	30
5.2	Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....		31
LAMPIRAN.....		37

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Kimia JC-1	12
Gambar 2.2 Kerangka Teori	14
Gambar 2.3 Kerangka Konsep	14
Gambar 3.1 Alur Penelitian.....	23
Gambar 4.1 Hasil Isolasi PBMC	24
Gambar 4.2 Hasil Kultur PBMC	25
Gambar 4.3 Hasil Pewarnaan JC-1	26
Gambar 4.4 Grafik Persebaran Sel Merah Setiap Konsentrasi	27

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Definisi Operasional.....	16
Tabel 3.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi Sampel.....	19
Tabel 4.1 Sel Merah didapatkan dari Konsentrasi 2 μ M.....	26
Tabel 4.2 Sel Merah didapatkan dari Konsentrasi 4 μ M.....	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	37
Lampiran 2. Surat Peminjaman Lab Terpadu.....	38
Lampiran 3. Surat Selesai Penelitian	39
Lampiran 4. Hasil Penelitian.....	40
Lampiran 5. Hasil Uji Statistik	44
Lampiran 6. Dokumentasi Kegiatan	47
Lampiran 7. Artikel Penelitian	53
Lampiran 8. Daftar Riwayat Hidup.....	64

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tubuh memiliki sistem kekebalan tubuh sebagai pelindung dari segala komponen yang dapat menginfeksi tubuh sehingga menjadi sebuah penyakit. Di berbagai jenis sel sebagai sistem imun salah satunya adalah *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC). PBMC terdiri dari beberapa komponen didalamnya seperti limfosit, monosit dan makrofag.¹ PBMC merupakan sekumpulan sel inflamasi yang besar dan mudah untuk diperoleh sehingga dapat memberikan informasi terkait sistem kekebalan tubuh.²

Mitokondria menjadi penghasil energi pada sel yang membentuk energi melalui pembentukan adenosin trifosfat (ATP) dari fosforilasi oksidatif (OXPHOS)³. Mitokondria dengan sel imun memiliki keterkaitan karena mitokondria memproduksi ATP sebagai aktivitas sel, metabolisme energi dan respon terhadap infeksi ataupun imun. Pembentukan ATP pada mitokondria terjadi karena adanya potensi membran mitokondria.⁴

Pada penilaian aktivitas mitokondria atau potensi membran mitokondria dapat menggunakan pewarnaan mitokondria. Mitokondria dapat diwarnai dengan beberapa pewarnaan, salah satunya JC-1.⁵ Pada pewarnaan mitokondria membutuhkan konsentrasi sebagai respons dari potensi membran mitokondria⁶. Terdapat akumulasi JC-1 pada mitokondria yang membentuk agregat J. Agregat J memberikan warna pada potensi membran mitokondria sehingga hal tersebut dapat mendeteksi bagaimana potensi dari potensi membran mitokondria.⁷ Pada sel yang sehat dengan potensi membran mitokondria yang normal, pewarna JC-1 akan memasuki dan terakumulasi di dalam mitokondria yang memiliki energi dan muatan negatif, dan secara otomatis membentuk agregat yang menghasilkan fluoresensi merah. Sebaliknya, pada sel yang tidak sehat atau mengalami apoptosis, pewarna JC-1 juga masuk ke dalam mitokondria namun dalam jumlah yang lebih sedikit karena bagian dalam mitokondria memiliki

muatan yang kurang negatif akibat peningkatan permeabilitas membran dan kehilangan potensial elektrokimia.⁸

Beberapa peneliti terdahulu telah melakukan penelitian terkait pewarnaan mitokondria dengan JC-1, namun sebagian besar penelitian menggunakan konsentrasi JC-1 sebesar 2 μM . Sementara itu, terdapat penelitian lain menunjukkan penggunaan metode JC-1 pada PBMC dengan konsentrasi lebih dari 2 μM .^{9,10} Maka dari itu, dilakukannya penelitian ini bertujuan untuk melihat optimasi dan penggunaan konsentrasi JC-1 khusus untuk PBMC. Selain itu, penelitian ini juga melihat penggunaan konsentrasi yang berbeda antara konsentrasi 2 μM dengan 4 μM serta menentukan konsentrasi yang tepat untuk melihat fungsi mitokondria.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah penggunaan konsentrasi JC-1 yang berbeda akan mempengaruhi viabilitas JC-1 untuk diabsorpsi oleh mitokondria pada sel PBMC.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi penggunaan konsentrasi JC-1 yang berbeda pada potensi membran mitokondria terhadap sel.

1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi optimal pada PBMC dan mengamati secara visual pada penggunaan JC-1 konsentrasi sebesar 2 μM dan 4 μM .

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Bagi peneliti, membantu menentukan konsentrasi yang tepat untuk memberikan hasil yang akurat pada potensi membran mitokondria dan dapat meningkatkan pemahaman tentang kesehatan mitokondria.
2. Bagi akademisi dan praktisi kesehatan, memberikan wawasan baru serta menjadi referensi terkait pemeriksaan aktivitas mitokondria dan kesehatan mitokondria.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 PBMC

2.1.1 Definisi

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) adalah sel darah berbentuk inti bulat yang menjadi respon utama dalam sistem kekebalan imun pada tubuh manusia¹. PBMC memiliki beberapa jenis sel imun di antaranya, sel T (~70%), sel B (~15%), monosit (~5%), sel dendritik (~1%), dan sel natural killer (NK) (~10%).¹¹ PBMC biasanya dimanfaatkan untuk mengevaluasi imunitas yang bergantung dengan sel secara umum dan darah perifer merupakan sumber utama sel mononuklear pada kultur in vitro.¹² Dari studi terdahulu, PBMC memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel darah, sel endotel, hepatosit, sel kardiomiogenik, sel otot polos, osteoblast, osteoklas, sel epitel, sel saraf, atau miofibroblas pada kondisi yang sesuai.¹³

2.1.2 Faktor yang Mempengaruhi PBMC

PBMC yang terdapat dalam sirkulasi darah adalah campuran kompleks dari berbagai subset sel imun yang berada pada berbagai tahap perkembangan. Selain dipengaruhi oleh variasi genetik alami dan tantangan imun, keragaman ini juga dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan. Berdasarkan pengetahuan yang ada saat ini, metabolisme sel memiliki peran penting dalam fungsi sel imun, yang menunjukkan potensi pengaruh metabolit dalam pengaturan sistem imun, baik secara langsung maupun tidak langsung.²

Faktor lain yang dapat mempengaruhi PBMC meliputi berbagai aspek yang dapat memengaruhi isolasi, viabilitas, dan fungsi sel. Pertama, faktor sebelum analisis seperti metode pengambilan darah, waktu pengambilan, dan kondisi penyimpanan darah sebelum isolasi sangat penting. Metode pengambilan darah yang tepat dan waktu

pengambilan yang konsisten dapat mempengaruhi komposisi PBMC. Selain itu, suhu dan durasi penyimpanan darah juga berperan dalam menjaga viabilitas sel.¹⁴ Faktor lingkungan seperti suhu penyimpanan dan pH media kultur juga dapat mempengaruhi stabilitas dan fungsi PBMC.¹⁵ Biologis, usia individu dan jenis kelamin dapat menyebabkan perbedaan dalam komposisi dan fungsi PBMC, dengan perbedaan yang signifikan antara anak-anak, dewasa, dan lansia, serta antara pria dan wanita.¹⁶ Kondisi kesehatan, termasuk penyakit kronis dan infeksi, juga dapat mempengaruhi jumlah dan fungsi PBMC. Selain itu, faktor imunologis seperti paparan antigen dan pengobatan dengan immunosupresan dapat mempengaruhi aktivasi dan proliferasi PBMC. Variasi genetik antar individu juga dapat mempengaruhi respons imun dan fungsi PBMC.¹⁷

2.2 Mitokondria

2.2.1 Morfologi Mitokondria

Mitokondria adalah organel yang dinamis dan memiliki membran ganda yang terlibat dalam pengaturan fungsi fisiologis serta sinyal pada sel.¹⁸ Mitokondria menjadi organel dalam sitoplasma yang memiliki dua lapisan membran dan memiliki genom yang dapat mereplikasi dirinya sendiri. Organel ini menjalankan fungsi biokimia yang krusial untuk menjaga keseimbangan metabolik dan berperan penting dalam menentukan kematian serta kelangsungan hidup sel. Pada organisme eukariotik, mitokondria memproduksi energi dalam bentuk ATP melalui proses metabolisme oksidatif dari nutrisi. Semua proses diatur oleh kompleks faktor transkripsi yang terdapat di dalam mitokondria. Setiap mitokondria memiliki antara 800 hingga 1000 salinan mtDNA, yang diwariskan dari ibu dan terorganisir dalam struktur nukleoprotein yang disebut nukleoid.¹⁹

Mitokondria terkenal karena perannya dalam sintesis ATP melalui siklus redoks protein pada rantai transpor elektron di membran

dalam mitokondria. Kompleks dalam rantai transpor elektron membentuk kompleks yang lengkap dan memberikan peningkatan efisiensi produksi ATP di mitokondria. Bentuk mitokondria di dalam sel diatur sesuai dengan kebutuhan dari energi, jenis sel, dan sumber daya metabolik yang tersedia. Terdapat hubungan erat antara bentuk dan aktivitas mitokondria. Mitokondria yang lebih panjang memiliki organisasi krista yang kompleks, yang berkontribusi pada peningkatan produksi ATP.¹⁸

Mitokondria memiliki potensi membran mitokondria menjadi salah satu hal penting bagi mitokondria karena menghasilkan potensial listrik.²⁰ Sehingga potensial listrik itulah yang dapat menjadi pengukur pada keadaan fisiologis untuk memantau kesehatan dari mitokondria.²¹

2.2.2 Peran Mitokondria

Mitokondria sering dijuluki sebagai pembangkit tenaga sel karena perannya yang sangat penting dalam menghasilkan adenosin trifosfat (ATP) melalui proses fosforilasi oksidatif (OXPHOS), di mana rantai transportasi elektron memompa proton melintasi membran dalam mitokondria, menciptakan gradien elektro-kimia yang digunakan untuk sintesis ATP. Peran mitokondria tidak hanya sekedar memproduksi energi melainkan banyak fungsi lainnya yang membuat mitokondria sangat penting dalam fungsi seluler biologi yang dapat mendukung kesehatan dan kelangsungan hidup sel. Peran yang dimiliki oleh mitokondria adalah sebagai berikut:²²

1. Pengaturan metabolisme sel

Mitokondria memiliki peran penting dalam pengaturan metabolisme sel dengan mengatur aliran metabolit melalui siklus asam sitrat (TCA). Selain berfungsi untuk menghasilkan energi, siklus ini juga menyediakan prekursor yang diperlukan untuk sintesis asam amino dan senyawa penting lainnya. Selain itu, mitokondria berperan dalam proses katabolisme, di mana mereka

memecah molekul besar menjadi komponen yang lebih kecil untuk menghasilkan energi.

2. Sinyal untuk sel

Peran mitokondria dalam persinyalan sel mampu melepaskan metabolit yang berfungsi sebagai sinyal untuk memengaruhi proses epigenetik dan komunikasi antar sel. Sebagai contoh, metabolit seperti succinate yang dihasilkan oleh mitokondria dapat berfungsi sebagai sinyal antar sel yang memengaruhi respons sel terhadap kondisi stres

3. Pengaturan kalsium

Mitokondria memainkan peran penting dalam mengatur kadar kalsium dalam sel dengan mengambil kalsium dari sitosol melalui uniporter kalsium mitokondria, yang sangat penting untuk berbagai fungsi seluler, termasuk sinyal dan kontraksi otot.

4. Produksi ROS

Mitokondria menghasilkan spesies reaktif oksigen (ROS) sebagai produk sampingan dari respirasi seluler yang dapat berfungsi sebagai sinyal dalam proses seluler, tetapi produksi ROS yang berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan sel.

Mitokondria juga terlibat dalam proses kematian sel, yang mencakup apoptosis, nekroptosis, dan autofagi. Selain itu, perubahan pada potensi membran mitokondria dapat berfungsi sebagai indikator awal terjadinya kematian sel.²³

2.2.3 Kondisi Mitokondria yang Berfungsi dan Disfungsi

Mitokondria dikenal sebagai pembangkit tenaga yang menghasilkan lebih dari 90% ATP yang dibutuhkan untuk metabolisme sel. Selain itu, mitokondria berperan dalam berbagai aspek metabolisme dan fungsi sel, serta berkontribusi dalam pengaturan homeostasis ion,

pertumbuhan sel, status redoks, dan pensinyalan sel. Mitokondria memiliki peran krusial dalam kelangsungan hidup sel dan mekanisme kematian sel. Mengingat peran sentralnya dalam proses kehidupan dan kematian sel, mitokondria juga terlibat dalam patogenesis dan perkembangan berbagai penyakit manusia, termasuk kanker, gangguan neurodegeneratif, penyakit kardiovaskular, diabetes, cedera otak traumatis, dan peradangan.²³

Mitokondria yang berfungsi dengan baik memiliki sejumlah karakteristik penting yang mendukung kinerja seluler yang optimal. Pertama, mitokondria ini memiliki potensi membran yang tinggi, yang sangat penting untuk produksi adenosin trifosfat (ATP) melalui proses respirasi sel. Selain itu, mitokondria yang sehat dapat memproduksi ATP dengan efisien, berkat keterlibatan siklus asam sitrat dan rantai transportasi elektron.²⁴ Keseimbangan dalam produksi spesies oksigen reaktif (ROS) juga merupakan aspek penting, di mana mitokondria dapat menghasilkan ROS dalam jumlah yang tepat, berfungsi sebagai sinyal dalam jalur metabolik tanpa menyebabkan kerusakan oksidatif yang berlebihan. Keutuhan DNA mitokondria yang bebas dari mutasi yang signifikan juga sangat penting untuk fungsi dan reproduksi mitokondria yang normal. Dari segi struktur, mitokondria yang sehat menunjukkan morfologi yang baik dengan keseimbangan antara proses fusi dan fisi, yang penting untuk pemeliharaan dan distribusi mitokondria di dalam sel.²⁵ Selain itu, mitokondria yang sehat memiliki kemampuan untuk mengatur kadar kalsium dalam sel, yang sangat penting untuk berbagai fungsi seluler, termasuk kontraksi otot dan pelepasan neurotransmitter. Mereka juga mampu merespons stres dengan baik, beradaptasi terhadap kondisi oksidatif dan lingkungan yang berubah, serta meningkatkan produksi antioksidan untuk melindungi diri dari kerusakan.²⁶ Terakhir, mitokondria yang sehat dapat melakukan mitofagi, yaitu proses untuk menghilangkan mitokondria yang tidak berfungsi, sehingga menjaga kesehatan sel

secara keseluruhan. Karakteristik ini menunjukkan bahwa mitokondria beroperasi dengan baik dan berkontribusi pada kesehatan sel dan tubuh secara keseluruhan.²⁷

Disfungsi mitokondria berperan penting dalam perkembangan berbagai penyakit, termasuk penyakit neurodegeneratif seperti Alzheimer dan Parkinson, serta kanker, diabetes, dan penyakit jantung²³. Gangguan pada mitokondria salah satunya disebabkan oleh obesitas. Obesitas didefinisikan sebagai kelebihan berat badan berdasarkan klasifikasi WHO pada usia dewasa terbagi menjadi Kelas 1 (30,0 – 34,9), Kelas 2 (35,0 – 39,9), dan Kelas 3 (>40,0).²⁸ Obesitas juga menyebabkan perubahan-perubahan di dalam tubuh, seperti terdapat inflamasi yang menyebabkan peningkatan dari produksi ROS dan stres oksidatif. Selain itu, adanya pasokan nutrisi berlebih yang dapat mengganggu siklus krebs dan pembentukan ROS menjadi lebih tinggi sehingga menjadi faktor dari disfungsi mitokondria.²⁹

2.2.4 Potensi Membran Mitokondria

Potensi membran mitokondria merupakan parameter penting dalam pengukuran fungsi mitokondria. Bagian ini menjadi salah satu indikator dalam kesehatan sel sehingga dapat menunjukkan fungsi mitokondria yang baik atau buruk.³⁰

Potensi membran mitokondria dihasilkan melalui proses redoks yang berhubungan dengan aktivitas siklus krebs, yang berfungsi sebagai cadangan energi yang digunakan oleh ATP sintase untuk memproduksi ATP. Proses ini tidak hanya menghasilkan potensial listrik (akibat pemisahan muatan), tetapi juga menciptakan gradien proton, yang keduanya membentuk potensial transmembran ion hidrogen.²⁰

Potensi membran mitokondria tergambar melalui warna dari agregat pada pewarnaan mitokondria. Terbagi menjadi dua, yaitu merah dan hijau. Apabila sel sehat, maka fluoresensi menjadi merah. Namun,

adanya perubahan dalam potensi listrik dari potensial membran mitokondria membuat sel menjadi sakit, menyebabkan agregat menjadi warna hijau. Hasil pewarnaan menjadi penentu dari kondisi pada fungsi mitokondria.⁵

2.3 Pewarnaan Mitokondria

2.3.1 Definisi

Pewarnaan mitokondria adalah teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi dan memvisualisasikan mitokondria dalam sel menggunakan pewarna atau fluorofor tertentu. Teknik ini penting dalam penelitian biomedis untuk mempelajari fungsi mitokondria, morfologi, dan peran mereka dalam berbagai kondisi patologis. Pewarnaan mitokondria dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis pewarna yang dapat memberikan informasi tentang potensi membran mitokondria, massa mitokondria, dan produksi ROS.³¹

Metode pewarnaan mitokondria telah dilakukan oleh sebagian besar peneliti untuk melakukan pemeriksaan potensi membran mitokondria menggunakan pewarna fluoresen yang mengukur potensi membran mitokondria untuk memantau perubahan dalam parameter fisiologis mitokondria yang penting, karena berkaitan dengan kemampuan sel untuk memproduksi ATP melalui fosforilasi oksidatif. Oleh karena itu, pewarnaan mitokondria menjadi indikator utama dari kesehatan atau kerusakan sel.³⁰

Potensi mitokondria dapat dievaluasi pada tingkat sel tunggal atau mitokondria tunggal dengan menggunakan kombinasi pewarna fluoresen tertentu. Mengingat mitokondria adalah komponen penting dalam mekanisme pensinyalan kematian sel, morfologinya sangat peka terhadap kondisi kesehatan sel. Oleh karena itu, sangat penting untuk berhati-hati agar tidak terjadi gangguan pada organel ini selama proses pencitraan.³²

2.3.2 Jenis-Jenis Pewarnaan pada Mitokondria

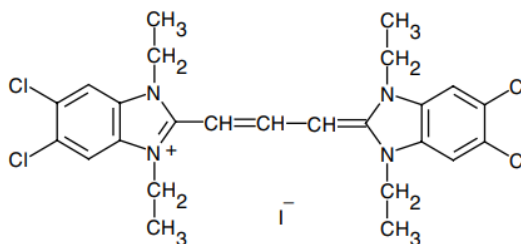
Memahami dan mengevaluasi fungsi mitokondria, berbagai teknik pewarnaan telah dikembangkan. Pewarna ini memungkinkan peneliti untuk secara visual memantau perubahan pada potensi membran mitokondria dan karakteristik mitokondria lainnya dalam sel hidup. Beberapa pewarna yang umum digunakan termasuk Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM), Tetramethylrhodamine Ethyl Ester (TMRE), Rhodamine 123 (Rhod123), JC-1, dan DiOC6(3). Masing-masing pewarna ini memiliki karakteristik unik, termasuk afinitas terhadap mitokondria, kecepatan permeasi, dan potensi toksisitas, yang mempengaruhi pemilihan pewarna yang tepat untuk eksperimen tertentu.^{33,34,35}

Pada penelitian terdahulu menunjukkan bahwa hasil analisis yang didapatkan pada pewarnaan mitokondria untuk melihat fungsi pada mitokondria menunjukkan bahwa JC-1 menjadi pewarna yang lebih sensitif dibanding pewarnaan lain sehingga bisa menilai keadaan dari fungsi mitokondria lebih baik.³⁵

2.4 JC-1

2.4.1 Definisi

JC-1(5-5'-6,6'-1,1'-3,3'-tetrachloro-tetraethyl-benzimidazolo-carbocyanine iodide) adalah salah satu pewarna sianin yang mampu masuk ke mitokondria dan membentuk suatu kompleks reversibel yang disebut agregat J⁸. JC-1 memberikan informasi bagaimana kondisi dari mitokondria melalui rasio fluoresensi merah dan hijau.³⁶ Sel dengan potensial tinggi akan membentuk agregat JC-1 dan memancarkan fluoresensi merah (emisi pada ~590 nm); sel dengan potensial rendah akan mengandung JC-1 monomerik dan akan memancarkan fluoresensi hijau (emisi pada ~520 nm).³⁷



Gambar 2.1 Struktur Kimia JC-1

JC-1 telah banyak digunakan untuk memperkirakan dan mengukur potensi membran mitokondria baik secara mikroskopis maupun sitometrik. Hal ini disebabkan oleh kemampuannya untuk membentuk agregat J yang dapat dibedakan secara spektral dari monomer pewarna pada konsentrasi tinggi, yang tercapai dalam mitokondria yang aktif pada sel yang terpapar konsentrasi eksternal pewarna yang mendekati mikromolar.⁶

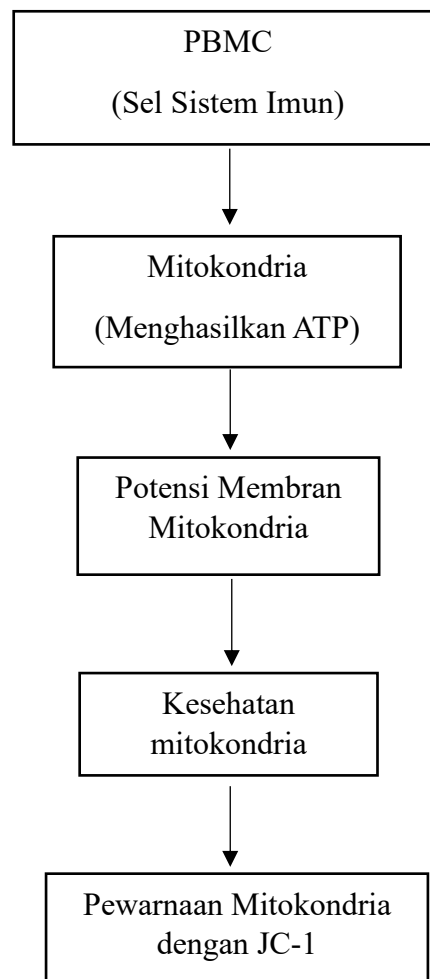
2.4.2 Faktor yang Mempengaruhi Hasil JC-1

Faktor yang mempengaruhi hasil pewarnaan JC-1 dalam penelitian kesehatan mitokondria meliputi kondisi sel, konsentrasi JC-1, waktu inkubasi, dan potensi membran mitokondria. Selain itu, faktor eksternal seperti pH, suhu, dan keberadaan senyawa lain juga dapat memengaruhi akurasi dan interpretasi hasil pewarnaan.³⁶

Hasil pengukuran menggunakan JC-1 merupakan pewarna umum untuk menilai potensi membran mitokondria, dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor. Konsentrasi pewarna yang digunakan sangat penting; dosis yang terlalu rendah mungkin tidak memberikan sinyal yang cukup, sementara dosis yang terlalu tinggi dapat menyebabkan akumulasi non-spesifik. Selain itu, waktu inkubasi sel dengan JC-1 juga berpengaruh, inkubasi yang terlalu singkat mungkin tidak memungkinkan pewarna untuk masuk ke dalam mitokondria, sedangkan inkubasi yang terlalu lama dapat mengubah potensi membran. Suhu selama inkubasi juga memainkan peran, di mana suhu yang lebih tinggi dapat meningkatkan aktivitas sel, sedangkan suhu

yang lebih rendah dapat menghambatnya.³⁸ Kesehatan sel juga harus diperhatikan, karena sel yang tidak sehat atau mati mungkin tidak menunjukkan hasil yang akurat. pH media kultur sel dapat mempengaruhi akumulasi JC-1 dalam mitokondria, di mana pH yang tidak sesuai dapat mempengaruhi stabilitas pewarna. Selain itu, jenis sel yang digunakan dalam eksperimen dapat memiliki karakteristik mitokondria yang berbeda, yang dapat mempengaruhi hasil pengukuran. Stres oksidatif yang tinggi, yang ditandai dengan peningkatan produksi ROS, juga dapat mempengaruhi potensi membran mitokondria dan hasil pengukuran JC-1.³⁴

2.5 Kerangka Teori



Gambar 2.2 Kerangka Teori

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.3 Kerangka Konsep

2.7 Hipotesis

H0 : Pada penelitian ini penggunaan konsentrasi JC-1 yang berbeda tidak memberikan dampak pada deteksi dari potensi membran mitokondria

H1 : Hipotesis dari penelitian ini adalah pada penggunaan konsentrasi JC-1 yang berbeda akan mempengaruhi hasil deteksi dari potensi membran mitokondria dan pada konsentrasi tertentu dapat memberikan hasil yang akurat.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Independen: Konsentrasi JC-1	Konsentrasi JC-1 mengacu pada Tingkat pewarna dalam sel yang digunakan untuk menilai fungsi dan kesehatan dari mitokondria	Mikroskop Fluoresens	PBMC diperiksa dengan JC-1 konsentrasi 2 μ M dan 4 μ M di mikroskop fluoresens.	Terdapat sel yang menyerap warna merah	Rasio 0 – 1 0 = sel tidak menyerap warna merah 1 = sel menyerap warna merah
Variabel Dependen: Penyerapan optimal JC-1 pada sel	Penilaian didapatkan dari sel yang menyerap warna merah dari pewarnaan JC-1	Mikroskop fluoresens	Melihat sel yang menyerap warna merah	Persentase sel berwarna merah dari total sel yang di amati	Rasio 0 – 1 0 = sel tidak menyerap warna merah 1 = sel menyerap warna merah

3.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah analitik eksperimental dimana penelitian ini akan melihat kondisi pada potensi membran mitokondria setelah diberi JC-1 dengan konsentrasi yang berbeda yang akan menjadi penilaian terhadap fungsi mitokondria pada PBMC.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian ini dimulai dari 15 Februari 2025 hingga 21 Februari 2025. Penelitian dilakukan dimulai dari pengambilan sampel darah dapat dilakukan di Klinik Spesialis FK UMSU dengan bantuan tenaga medis yang profesional. Isolasi serta kultur dan pewarnaan dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah pendonor yang memiliki darah sehat yang berasal dari vena dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Pemilihan populasi darah sehat bertujuan untuk memastikan bahwa hasil penelitian dapat memberikan gambaran yang akurat dan representatif mengenai karakteristik sel yang diteliti.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari populasi yang telah ditentukan dan terdiri dari sel-sel yang diisolasi dari darah sehat. Sel-sel ini akan digunakan untuk analisis lebih lanjut dalam penelitian ini, dengan tujuan untuk mengevaluasi karakteristik dan respons seluler dalam kondisi normal.

3.5 Teknik Pengambilan Data

3.5.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah:

1. Rak tube 15 mL
2. Biological Safety Cabinet (BSC 2) Class II
3. Refrigerated Laboratory Centrifuge MPW
4. S1 Pipette Filler
5. Fluorescence Microscope
6. Micropipette 1000 μ L
7. Micropipette 200 μ L
8. Micropipette 10 μ L
9. Inverted Microscope
10. Waterbath
11. Naubauer Chamber (Kamar hitung)
12. Inkubator CO₂ 5% 37°C

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel darah yang diambil dari sampel yang telah ditentukan sebanyak 5 mL
2. *Ficoll paque*
3. *Phosphate Buffered Saline* (PBS)
4. *Coverslips*
5. *Microscope slide*
6. Tabung falcon 15 mL
7. *Microtube*
8. *Tip micropipette* 10-1000 μ L
9. Tabung darah vaculab EDTA
10. Media kultur RPMI 1640
11. *24 well-plate*
12. *Serological pipette*
13. *Mitochondrial membrane potential detection kit* (JC-1)

3.5.3 Seleksi Sampel

Seleksi pendonor darah untuk sampel berdasarkan dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Adanya kriteria ini menjadi salah satu syarat pendonor diharapkan mendapat hasil yang baik nantinya. Kriteria inklusi dan eksklusi berupa:

Tabel 3.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi	Kriteria Eksklusi
Usia diatas 18 tahun	Memiliki riwayat penyakit darah
Dalam keadaan sehat	Indeks Massa Tubuh (IMT) di atas nilai normal (Obesitas)

Seleksi sampel dilakukan dengan menggunakan *purposive sampling* dimana penelitian ini mengambil sampel berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang sesuai.

3.5.4 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah akan dilakukan setelah sampel diberikan penjelasan mengenai penelitian yang akan dijalankan dan *informed consent*. Sampel darah di ambil sebanyak 5 ml menggunakan tabung vaculab EDTA. Darah di simpan dalam suhu ruang dan digunakan saat penelitian dalam waktu kurang dari 2 jam.

3.5.5 Isolasi PBMC

PBMC diisolasi menggunakan reagen histopaque yang dilakukan menggunakan tabung 15 ml. Langkah – langkah pengerjaan isolasi PBMC sebagai berikut:

1. Darah yang telah di ambil sebanyak 5 ml dimasukkan ke tabung 15 ml yang telah berisi *ficoll paque* dengan perbandingan 1:1 dan sentrifugasi selama 30 menit.
2. Hasil sentrifugasi terdapat 4 lapisan, yaitu *RBC*, *ficoll paque*, *buffy coat*, dan plasma

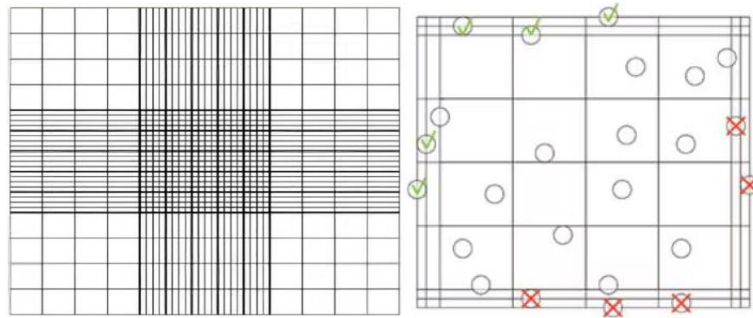
3. Ambil *buffy coat* secara hati – hati jangan sampai *ficoll paque* ikut terambil kemudian *buffy coat* dipindahkan ke tabung yang baru
4. *Buffy coat* di dalam tabung ditambahkan dengan PBS kemudian lakukan sentrifugasi kembali selama 10 menit
5. Didapatkan pellet PBMC dan lakukan pencucian sel agar sel menjadi bersih
6. PBMC dilakukan penyimpanan dengan memasukkan ke dalam cryovial dan disimpan di freezer dengan suhu -80°C .³⁹

3.5.6 Thawing dan Perhitungan sel pada PBMC

Thawing atau pencairan PBMC dilakukan dengan cara mengeluarkan cryovial dari freezer -80°C dengan cepat ke waterbath. Bagian cryovial dihangatkan dengan suhu 37°C selama 30-60 detik dan sisakan es pada vial sekitar 20%. Vial yang telah hangat dikeluarkan dari waterbath. RPMI dan FBS dimasukkan ke dalam tabung falcon dan masukkan suspensi sel dari vial yang telah hangat.³⁹

Perhitungan sel dilihat dengan cara menggunakan naubauer chamber yang telah dibersihkan dan dilihat menggunakan mikroskop inverted. Suspensi sel dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge sebanyak $10\mu\text{L}$ dan campurkan dengan trypan blue sebanyak $10\mu\text{L}$ sehingga keduanya memiliki perbandingan 1:1. Campuran dipipetkan sebanyak $10\mu\text{L}$ ke dalam naubauer chamber dengan mikropipet dan 5 suspensi akan menyebar di dalam naubauer chamber. Amati menggunakan mikroskop inverted kemudian sel di hitung dengan melihat sel yang hidup (sel berwarna cerah) dan sel mati (sel berwarna biru) serta melakukan penghitungan sel.⁴⁰

$\text{Jumlah sel hidup/mL} = \text{Jumlah resuspensi (ml)} \times 2 \times 10^4$



Gambar 3.1 Perhitungan sel

3.5.7 Kultur PBMC

PBMC dikultur dalam Complete Media yang berisi RPMI yang telah dipanaskan di dalam waterbath pada suhu 37°C selama 15 menit dengan 10% FBS. Media di aduk secara perlahan sebanyak tiga kali. Complete Media RPMI dipipet sebanyak 1 mL ke dalam 24 well plate. PBMC di inkubasi pada suhu 37°C CO2 5%. PBMC di amati setelah 1 malam dengan *inverted microscope*.³⁹

3.5.8 Perhitungan Konsentrasi JC-1

Penggunaan JC-1 dilakukan pengukuran untuk mengencerkan larutan. Pengukuran dilakukan bertujuan untuk mendapatkan volume yang tepat dari konsentrasi yang berbeda. Sehingga konsentrasi yang didapatkan telah sesuai untuk digunakan saat melakukan pewarnaan pada sel PBMC. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:⁴¹

$$\text{Perhitungan} = C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Keterangan:

- C1: Konsentrasi awal larutan (sebelum pengenceran)
- V1: Volume larutan awal yang akan diencerkan
- C2: Konsentrasi akhir larutan (setelah pengenceran)
- V2: Volume akhir larutan setelah pengenceran

3.5.9 Pewarnaan Mitokondria Menggunakan JC-1

1. PBMC di kultur sesuai dengan protokol penelitian yang sedang dijalankan.
2. Tambahkan JC-1 *Staining solution* per 500 μL condition media dengan konsentrasi yang ditentukan sebelumnya
3. Aduk perlahan dengan pipet *up and down*
4. Masukkan kedalam plate kultur
5. Inkubasi sampel CO_2 dalam inkubator 37°C selama 15 menit
6. Setelah di inkubasi amati sel dengan *zoe fluorescent cell imager*
7. Akan terlihat gambaran sel yang menyerap agregat berwarna merah.⁴²

3.6 Pengolahan dan Analisis Data

3.6.1 Pengolahan Data

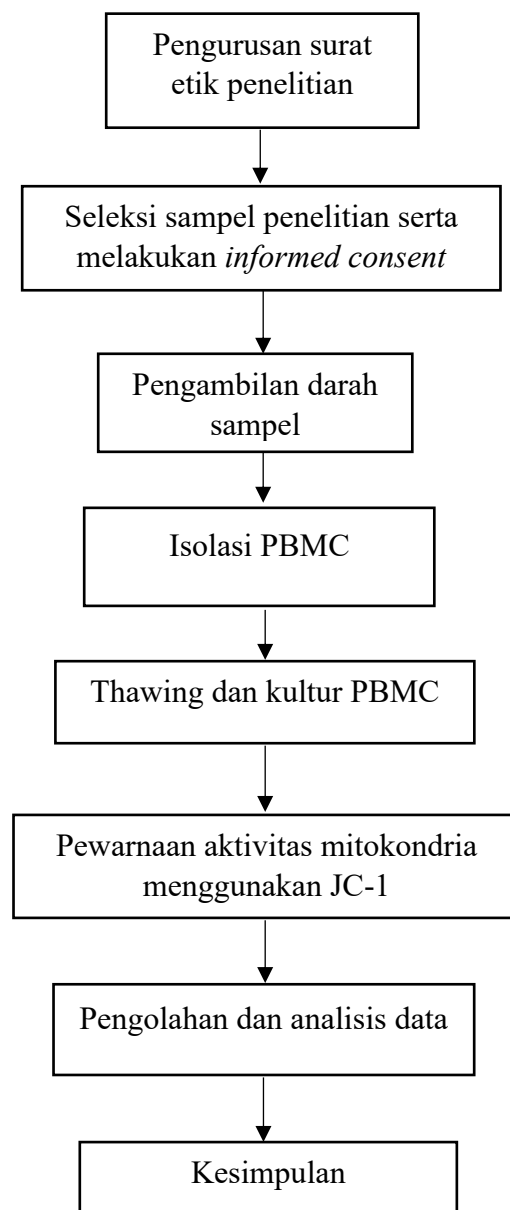
Pengolahan data akan dilakukan menggunakan perangkat lunak komputer, yaitu *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Perlu melakukan beberapa langkah agar dapat di olah dengan baik, seperti pemeriksaan data, memberi kode pada data agar tidak tertukar, memasukkan serta membersihkan data dan menganalisis data yang telah terkumpul.

3.6.2 Analisis Data

Setelah data dikumpulkan dan diproses, langkah selanjutnya adalah menganalisis data. Jumlah sampel penelitian ditentukan berdasarkan perhitungan untuk uji beda dua rata-rata (*independent t-test*). Proses analisis data dimulai dengan analisis univariat untuk menilai distribusi dan karakteristik masing-masing variabel, seperti viabilitas dan sel PBMC yang telah diwarnai dengan JC-1 pada konsentrasi berbeda, dengan menghitung statistik deskriptif berupa rata-rata, median, standar deviasi, dan frekuensi. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menguji normalitas data. Jika data berdistribusi normal, digunakan uji *independent t-test*. Namun, apabila tidak

berdistribusi normal, digunakan uji Mann-Whitney untuk membandingkan kelompok. Tingkat signifikansi yang digunakan adalah 5%. Jika $p < 0,05$ maka H_1 diterima (terdapat perbedaan signifikan), sedangkan jika $p > 0,05$ maka H_0 diterima (tidak terdapat perbedaan signifikan).

3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

BAB 4

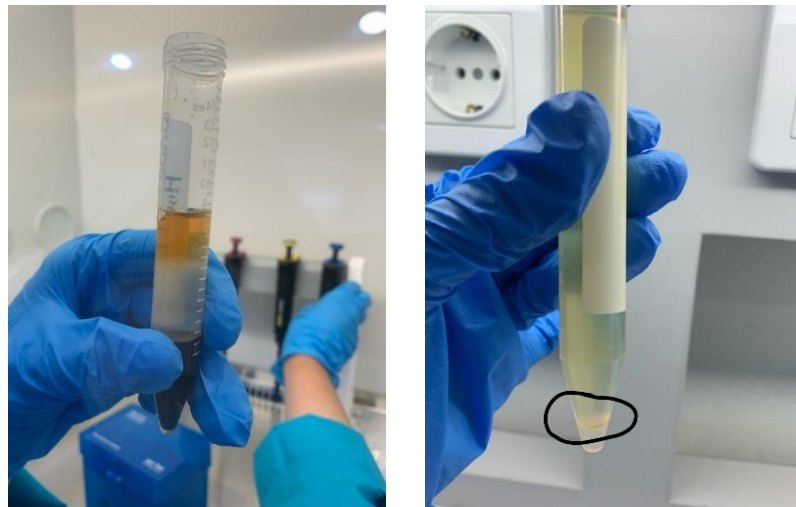
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara yang berjalan dimulai dari tanggal 18 Februari 2025 hingga 21 Februari 2025. Penelitian ini dilakukan sesuai dengan prosedur dan aturan yang berlaku dan telah mendapatkan izin penelitian dari Komite Etik FK UMSU dengan No. 1193/KEPK/UMSU/2024.

4.1.1 Isolasi PBMC

Isolasi PBMC didapat melalui sampel darah yang di ambil dari donor sehat sebanyak 5 mL yang kemudian dilakukan menggunakan kit khusus untuk isolasi PBMC dan didapatkan 4 lapisan yang terdiri dari plasma, buffy coat, ficoll paque, dan RBC. Buffy coat di ambil kemudian dilakukan pencucian sel dan menghasilkan pellet PBMC.



Gambar 4.1 Hasil Isolasi PBMC

4.1.2 Perhitungan Sel

Perhitungan sel digunakan untuk melihat sel hidup dan jumlah dari sel hidup menggunakan rumus sebagai berikut:

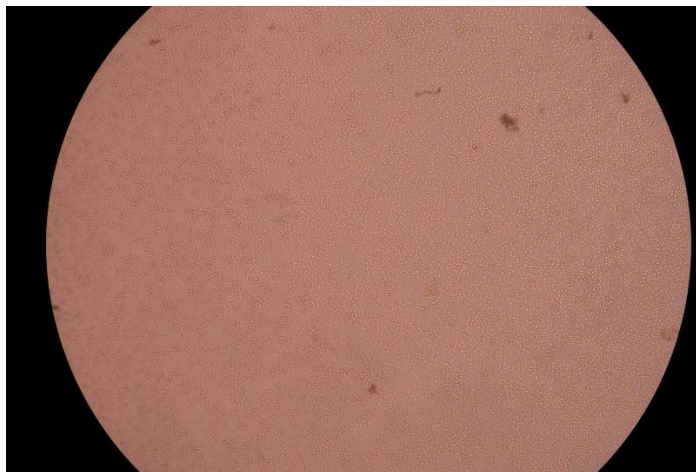
$$\text{Jumlah sel hidup/mL} = \text{Jumlah resuspensi (ml)} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{Jumlah sel hidup dalam kamar hitung} = 153 \text{ sel}$$

$$153 \times 2 \times 10^4 = 3.060.000 \text{ sel}$$

4.1.3 Kultur PBMC

Kultur PBMC dilakukan selama 24 jam menggunakan 24 *well plate*. Hasil kultur didapatkan sel menempel pada permukaan *well* sehingga menggambarkan sel yang sehat dan aktif.



Gambar 4.2 Hasil Kultur PBMC

4.1.4 Perhitungan Konsentrasi JC-1

Pada penelitian ini menggunakan JC-1 dengan volume 5 mg dan diencerkan untuk mendapatkan volume dari dua konsentrasi yang digunakan, yaitu 2 μM dan 4 μM , maka didapatkan perhitungan sebagai berikut:

Konsentrasi 2 μM :

$$5000\mu\text{M} \times \mu\text{L} = 2 \mu\text{M} \times 1000 \mu\text{L} = 2000/5000 = 0,4 \mu\text{L}/1 \text{ mL}$$

Konsentrasi 4 μM :

$$5000\mu\text{M} \times \mu\text{L} = 4 \mu\text{M} \times 1000 \mu\text{L} = 1000/5000 = 0,8 \mu\text{L}/1\text{mL}$$

4.1.5 Pewarnaan Mitokondria dengan JC-1

Pewarnaan mitokondria menggunakan JC-1 memberikan hasil bermakna bagi aktivitas mitokondria. Pewarnaan ini diperiksa menggunakan mikroskop fluoresens. Hasil yang didapatkan dari pewarnaan adalah terdapat sel yang menyerap warna merah. Sel yang menyerap warna merah dihitung di masing – masing well pada setiap

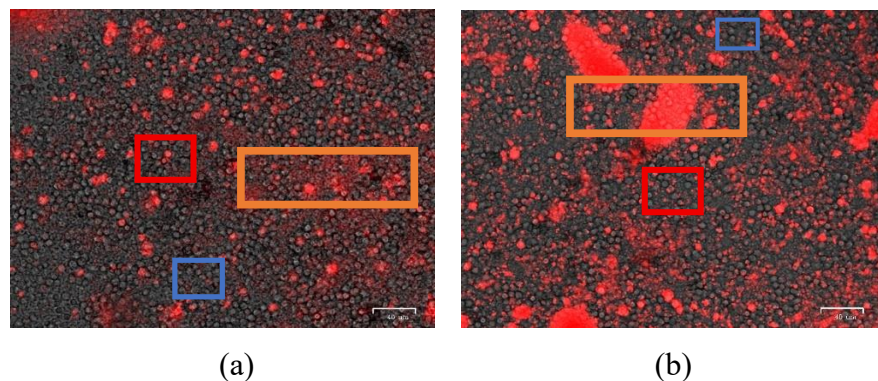
konsentrasi. Sel yang didapatkan pada konsentrasi yang berbeda adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Sel Merah didapatkan dari Konsentrasi 2 μM

Well Plate	Sel Menyerap Merah
1	60
2	53
3	34

Tabel 4.2 Sel Merah didapatkan dari Konsentrasi 4 μM

Well Plate	Sel Menyerap Merah
1	34
2	44
3	24



Gambar 4.3 Hasil Pewarnaan dengan JC-1

Keterangan :

(a) Konsentrasi 2 μM

(b) Konsentrasi 4 μM

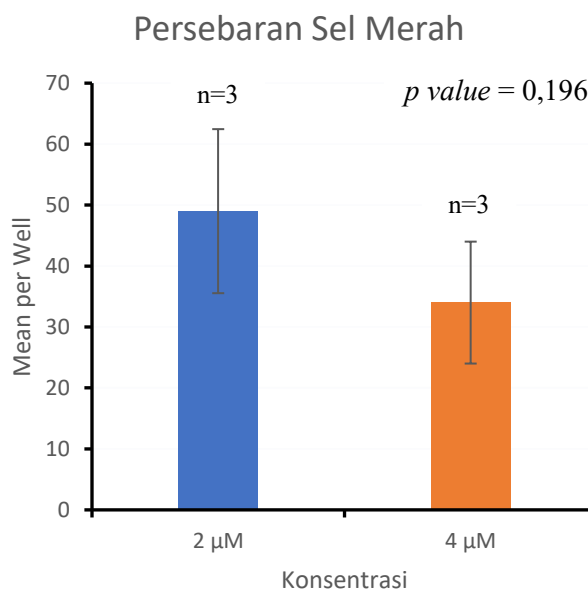
Kotak merah : Sel yang menyerap warna merah

Kotak jingga : Warna merah tidak merata sehingga tidak bisa terhitung

Kotak biru : Sel yang tidak menyerap warna merah

4.1.6 Analisis Data Pewarnaan JC-1

Hasil data menunjukkan analisis terhadap dua konsentrasi, yaitu Konsentrasi 2 μM dan Konsentrasi 4 μM . Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai p dari kedua kelompok konsentrasi, yaitu pada konsentrasi 2 μM p (0,503) dan konsentrasi 4 μM p (1,000). Keduanya memiliki nilai $p > 0,05$ menandakan bahwa data terdistribusi secara normal. *Independent T Test* dilakukan untuk membandingkan jumlah JC-1 rata – rata per lapang pandang antara konsentrasi 2 μM dan konsentrasi 4 μM . Konsentrasi 2 μM memiliki mean sebesar 49,00 dan standar deviasi 13,454. Sebaliknya, Konsentrasi 4 memiliki mean 34,00 dan standar deviasi 10,00. Namun, pada perbedaan keduanya memiliki statistik dengan signifikansi $p = 0,196$. Angka tersebut menunjukkan nilai sig. $p > 0,05$ sehingga didapatkan kedua kelompok tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Berdasarkan uji daya (*power*) pada penelitian ini didapatkan hasil sebesar 37% yang menggambarkan bahwa penelitian ini memiliki daya yang lemah.



Gambar 4.4 Grafik Persebaran Sel Merah Setiap Konsentrasi

4.2 Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, secara pengamatan didapatkan sel yang menyerap agregat merah pada kelompok konsentrasi 2 μM lebih banyak dibandingkan kelompok konsentrasi 4 μM . Dalam penelitian ini menggunakan *zoe fluorescent cell imager* untuk melihat hasil dari pewarnaan JC-1. Dalam mikroskop tersebut hanya menggunakan satu filter warna, yaitu warna merah saja dan pengukuran warna merah dan hijau tidak bisa dilakukan secara bersamaan dikarenakan kurang sensitif untuk menilai kondisi mitokondria sehingga hasil menjadi tidak maksimal.

Diketahui JC-1 adalah pewarna kationik yang diserap oleh mitokondria berkaitan langsung dengan tingkat potensi membran mitokondria. Semakin tinggi penyerapan mitokondria, semakin banyak konsentrasi bentuk agregat JC-1 yang menghasilkan sinyal emisi fluoresensi merah, dibandingkan dengan bentuk monomer JC-1 yang memancarkan fluoresensi hijau. Penilaian mitokondria juga dapat berdasarkan dari sel yang menyerap warna merah sehingga semakin banyak sel yang menyerap warna merah, potensi membran mitokondria bernilai lebih besar.⁴⁵

Penggunaan JC-1 pada konsentrasi 2 μM dan 4 μM dalam penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan dalam viabilitas sel antara kedua konsentrasi tersebut. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, kedua konsentrasi mungkin berada dalam rentang yang cukup untuk mencapai saturasi dalam pengukuran potensi membran mitokondria, sehingga tidak ada perbedaan yang terlihat. Selain itu, variabilitas dalam eksperimen, seperti perbedaan dalam kultur sel dan kondisi lingkungan, dapat mempengaruhi hasil. Respons sel terhadap JC-1 juga dapat bervariasi tergantung pada jenis sel yang digunakan, beberapa sel mungkin lebih sensitif terhadap perubahan konsentrasi, sementara yang lain tidak. Metode analisis yang digunakan untuk mengevaluasi data juga berperan penting analisis statistik yang tepat diperlukan untuk menentukan signifikansi perbedaan. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, seperti 4 μM , mungkin ada efek toksisitas yang dapat mempengaruhi viabilitas sel, sehingga mengimbangi potensi

peningkatan sinyal fluoresensi. Maka dari itu, didapatkan tren penurunan jumlah sel merah antara konsentrasi 2 μM dan 4 μM .

Penelitian yang dilakukan oleh Figuiera *et al.*, 2012 menunjukkan bahwa konsentrasi JC-1 yang tinggi membuat endapan menjadi sulit dibersihkan.⁴⁶ Hal ini menggambarkan pada penggunaan konsentrasi 4 μM pada pewarnaan cukup sulit di nilai karena banyak nya endapan yang ada pada sel sehingga cukup sulit menilai sel yang menyerap agregat merah.

Keterbatasan dari penelitian ini adalah kurangnya sampel pada penelitian. Hal ini dikarenakan merupakan penelitian terbaru sehingga mencoba untuk memulai dari sampel seminimal mungkin untuk melihat sejauh mana perbedaan awal antar kelompok perlakuan. Selain itu, penelitian ini tidak dilakukan dengan teknik *blind* sehingga ditakutkan hasil bias. Kemudian masih banyaknya membutuhkan referensi tambahan mengenai penggunaan pewarna JC-1 karena masih jarang nya penelitian yang menggunakan konsentrasi pada JC-1 selain dari 2 μM .

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Sel yang menyerap agregat merah dapat menunjukkan potensi membran mitokondria yang lebih besar.
2. Secara visual menunjukkan terdapat tren penurunan jumlah sel merah antara konsentrasi 2 μM dengan konsentrasi 4 μM . Penggunaan konsentrasi yang lebih rendah dapat lebih optimal dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Namun, hasil analisis statistik menunjukkan bahwa konsentrasi 2 μM dengan 4 μM tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

5.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan dari penelitian ini, maka terdapat beberapa saran yang dapat dilakukan untuk penelitian selanjutnya agar dapat memberikan penelitian yang lebih baik lagi. Saran dari penelitian ini adalah:

1. Penggunaan konsentrasi JC-1 yang paling optimal tetap konsentrasi 2 μM
2. Menggunakan jumlah sampel lebih banyak agar dapat meningkatkan kekuatan serta mendapat peluang besar untuk mendeteksi perbedaan secara statistik
3. Sebaiknya penelitian dilakukan dengan teknik *blind* untuk meminimalkan hasil bias.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pourahmad J, Salimi A. Isolated human peripheral blood mononuclear cell (PBMC), a cost effective tool for predicting immunosuppressive effects of drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res.* 2015;14(4):679-980.
2. Sen P, Kemppainen E, Orešič M. Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Front Mol Biosci.* 2018;4(JAN):1-11. doi:10.3389/fmolb.2017.00096
3. Tiwari-Heckler S, Robson SC, Longhi MS. Mitochondria Drive Immune Responses in Critical Disease. *Cells.* 2022;11(24):1-11. doi:10.3390/cells11244113
4. Creed S, McKenzie M. Measurement of mitochondrial membrane potential with the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM). *Methods Mol Biol.* 2019;1928:69-76. doi:10.1007/978-1-4939-9027-6_5
5. Sakamuru S, Zhao J, Attene-Ramos MS, Xia M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. *Methods Mol Biol.* 2022;2474:11-19. doi:10.1007/978-1-0716-2213-1_2
6. Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* 2012;3(11):1-7. doi:10.1038/cddis.2012.171
7. Elefantova K, Lakatos B, Kubickova J, Sulova Z, Breier A. Detection of the mitochondrial membrane potential by the cationic dye JC-1 in 11210 cells with massive overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1-14. doi:10.3390/ijms19071985
8. Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-protocol.* 2019;9(1):1-13. doi:10.21769/BioProtoc.3128

9. Dell'Anna ML, Maresca V, Briganti S, Camera E, Falchi M, Picardo M. Mitochondrial impairment in peripheral blood mononuclear cells during the active phase of vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2001;117(4):908-913. doi:10.1046/j.0022-202X.2001.01459.x
10. Chiu HY, Tsao LY, Yang RC. Heat-shock response protects peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from hydrogen peroxide-induced mitochondrial disturbance. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14(2):207-217. doi:10.1007/s12192-008-0075-8
11. Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al. The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models. *Impact Food Bioact Heal Vitr Ex Vivo Model.* Published online 2015:1-327. doi:10.1007/978-3-319-16104-4
12. Raulf M. T cell: Primary culture from peripheral blood. *Methods Mol Biol.* 2019;2020:17-31. doi:10.1007/978-1-4939-9591-2_2
13. Zhang M, Huang B. The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3(6):1-10.
14. Hope CM, Huynh D, Wong YY, et al. Optimization of blood handling and peripheral blood mononuclear cell cryopreservation of low cell number samples. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17). doi:10.3390/ijms22179129
15. Bonilauri B, Santos MDM, Camillo-Andrade AC, et al. The impact of blood-processing time on the proteome of human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2021;1869(3):1-8. doi:10.1016/j.bbapap.2020.140581
16. Huang Z, Chen B, Liu X, et al. Effects of sex and aging on the immune cell landscape as assessed by single-cell transcriptomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(33). doi:10.1073/pnas.2023216118

17. Aguirre-Gamboa R, Joosten I, Urbano PCM, et al. Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits. *Cell Rep.* 2016;17(9):2474-2487. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.053
18. Madan S, Uttekar B, Chowdhary S, Rikhy R. Mitochondria Lead the Way: Mitochondrial Dynamics and Function in Cellular Movements in Development and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9(February):1-23. doi:10.3389/fcell.2021.781933
19. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH, et al. HHS Public Access. 2018;1863(5):1066-1077. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.010.Mitochondrial
20. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, et al. HHS Public Access. Published online 2018:50-59. doi:10.1016/j.ab.2017.07.009.Mitochondrial
21. Li J, Kwon N, Jeong Y, Lee S, Kim G, Yoon J. Aggregation-Induced Fluorescence Probe for Monitoring Membrane Potential Changes in Mitochondria. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(15):12150-12154. doi:10.1021/acsami.7b14548
22. Monzel AS, Enríquez JA, Picard M. beyond function and dysfunction. 2024;5(4):546-562. doi:10.1038/s42255-023-00783-1.Multifaceted
23. Viscomi C, Zeviani M. Mitochondria in Health and Disease. *Clin Mitochondrial Med.* Published online 2018:1-9. doi:10.1017/9781139192460.002
24. Hoogenraad N. Mitochondria: In sickness and in health. *Today's Life Sci.* 1990;2(2):37-39. doi:10.1016/j.cell.2012.02.035.Mitochondria
25. Liu YJ, McIntyre RL, Janssens GE, Houtkooper RH. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mech Ageing Dev.* 2020;186(January):111212. doi:10.1016/j.mad.2020.111212

26. Li Y, Zhang H, Yu C, et al. New Insights into Mitochondria in Health and Diseases. *Int J Mol Sci*. 2024;25(18). doi:10.3390/ijms25189975
27. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*. 2015;13(1):1-11. doi:10.1186/s12915-015-0201-x
28. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12(September):1-9. doi:10.3389/fendo.2021.706978
29. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci*. 2018;192:26-32. doi:10.1016/j.lfs.2017.11.019
30. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Harris A. Gradient : a Practical Usage Guide. 2011;50(2):98-115. doi:10.2144/000113610.Mitochondrial
31. Jacobson J, Duchen MR, Heales SJR. Intracellular distribution of the fluorescent dye nonyl acridine orange responds to the mitochondrial membrane potential: Implications for assays of cardiolipin and mitochondrial mass. *J Neurochem*. 2002;82(2):224-233. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00945.x
32. Mitra K, Lippincott-Schwartz J. Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches. *Curr Protoc Cell Biol*. 2010;(SUPPLO. 46):4251-42521. doi:10.1002/0471143030.cb0425s46
33. Rottenberg H, Shaolong W. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 1998;1404(3):393-404. doi:10.1016/S0167-4889(98)00088-3
34. Scaduto RC, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*. 1999;76(1 I):469-477. doi:10.1016/S0006-3495(99)77214-0

35. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* 1997;411(1):77-82. doi:10.1016/S0014-5793(97)00669-8
36. Keil VC, Funke F, Zeug A, Schild D, Müller M. Ratiometric high-resolution imaging of JC-1 fluorescence reveals the subcellular heterogeneity of astrocytic mitochondria. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2011;462(5):693-708. doi:10.1007/s00424-011-1012-8
37. Lugli E, Troiano L, Cossarizza A. Polychromatic analysis of mitochondrial membrane potential using JC-1. *Curr Protoc Cytom.* 2007;Chapter 7(July):1-15. doi:10.1002/0471142956.cy0732s41
38. Nicholls DG. Fluorescence Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Changes in Cultured Cells.Pdf. 2018;1782:121-135.
39. Sapkota TDC and GP, Abstract. Characterization of Protein Complexes Using Chemical Cross-Linking Coupled Electrospray Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2016;(1341):257-284. doi:10.1007/7651
40. Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(JUN). doi:10.3389/fbioe.2019.00147
41. Roy D. Chemistry for the environment. *React Polym.* 1994;23(2-3):263. doi:10.1016/0923-1137(94)90031-0
42. Abcam. ab113850 JC-1 – Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit. 2022;(10009172).
43. Van Der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4 + T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes.* 2012;61(2):401-408. doi:10.2337/db11-1065

44. Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, et al. Peripheral blood mononuclear cells oxidative stress and plasma inflammatory biomarkers in adults with normal weight, overweight and obesity. *Antioxidants*. 2021;10(5). doi:10.3390/antiox10050813
45. Takegawa R, Hayashida K, Murao A, et al. The role of homogenization cycles and Poloxamer 188 on the quality of mitochondria isolated for use in mitochondrial transplantation therapy. *Sci Rep*. 2025;15(1):3350. doi:10.1038/s41598-025-86760-y
46. Figueira TR, Melo DR, Vercesi AE, Castilho RF. Mitochondrial Bioenergetics. *Mitochondrial Bioenerg Methods Protoc (Methods Mol Biol vol 810)*. 2012;810:103-117. doi:10.1007/978-1-61779-382-0

LAMPIRAN

Lampiran 1. *Ethical Clearance*



UMSU
Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL
"ETHICAL APPROVAL"
No : 1193/KEPK/FKUMSU/2024

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :
The Research protocol proposed by

Peneliti Utama : Syakirah Rihhadatul'aisy
Principal in investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
Name of the Institution Faculty of Medicine University of Muhammadiyah of Sumatera Utara

Dengan Judul
Title

"DAMPAK LATIHAN KOGNITIF HAFALAN AL-QUR'AN TERHADAP ASPEK NEURO IMMUNOLOGI"
"THE IMPACT OF COGNITIVE TRAINING IN MEMORIZING THE QUR'AN ON NEUROIMMUNOLOGICAL ASPECTS"

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah
3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Resiko, 5) Bujukan / Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan
7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion / Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicator of each standard

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 20 Mei 2024 sampai dengan tanggal 20 Mei 2025
The declaration of ethics applies during the periode Mei 20, 2024 until Mei 20, 2025



Medan, 20 Mei 2024
Ketet
Assoc. Prof. Dr. dr. Nurfady, MKT

Lampiran 2. Surat Peminjaman Lab Terpadu

Kepada Yth.

Medan, 15 Februari 2025

Dekan FK UMSU

Ibu dr. Siti Masliana Siregar, Sp. T.H.T.B.K.L., Subsp. Rinologi (K)
di Tempat

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Puji Syukur saya panjatkan kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala, sholawat serta salam senantiasa tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad shallallahu 'alaihi wa sallam. Dengan mengharap ridho Allah azza wa jalla semoga Ibu beserta keluarga besar/staff senantiasa dalam keadaan sehat wal afiat.Amin.

Melalui surat ini saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Syakirah Rihhadatul'aisy
NPM : 2108260087
Status : Mahasiswa S1 FK UMSU
Judul : Analisis Konsentrasi Penggunaan JC-1 Dalam Penilaian Aktivitas Mitokondria Pada PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

Bahwasanya saya akan melakukan penelitian dan bermaksud untuk memohon izin penggunaan ruangan laboratorium. Adapun ruangan laboratorium yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Laboratorium Terpadu FK UMSU.

Demikianlah surat permohonan ini saya sampaikan. Atas perhatian ibu, saya ucapkan terima kasih. Wassalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Hormat saya,

Syakirah Rihhadatul'aisy
NPM.2108260087

Lampiran 3. Surat Selesai Penelitian



Laboratorium Terpadu

SURAT KETERANGAN SELESAI PENELITIAN
 Nomor : 26/II.3.AU/UMSU-08-LAB.TERPADU/2025

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL., Subsp.Rino(K)
 Jabatan : Kepala Laboratorium Terpadu FK UMSU

Dengan ini menerangkan bahwasannya mahasiswa yang bernama:

Nama : Syakirah Rihhadatul' Aisy
 NPM : 2108260087
 Semester : VII (Tujuh)

Telah selesai melakukan penelitian di Laboratorium Terpadu FK UMSU dengan lancar dan sesuai dengan prosedur yang berlaku, terhitung mulai tanggal 18 hingga 21 Februari 2025 untuk memperoleh data penelitian dalam rangka penyusunan skripsi dengan judul "Analisis Konsentrasi Penggunaan JC-1 Dalam Penilaian Aktivitas Mitokondria Pada PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)"

Demikianlah surat keterangan ini dibuat dengan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Medan, 22 Sya'ban 1446 H
21 Februari 2025 M

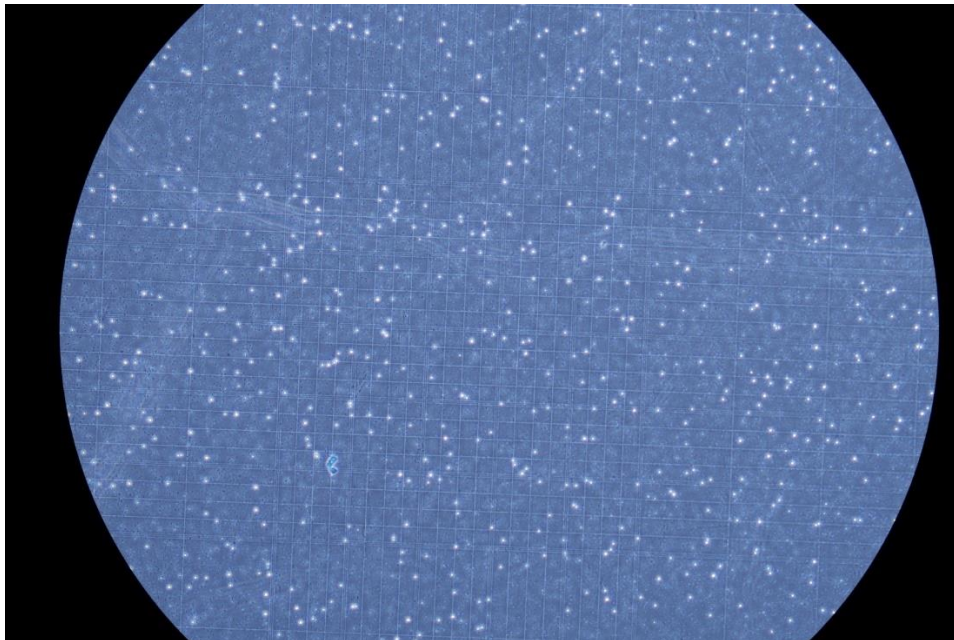
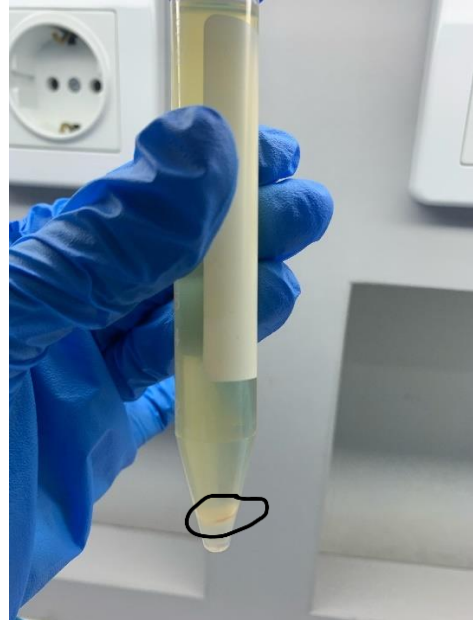
Kepala Laboratorium Terpadu

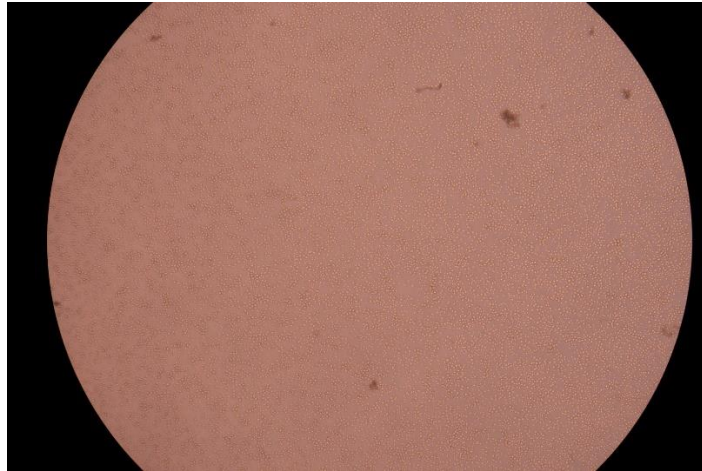
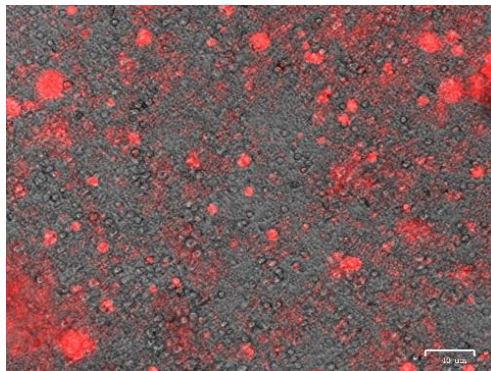
(dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL., Subsp.Rino (K))

Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217
 Telp. (061) 7350163 – 7333162
 Fax. (061) 7363488
 Website : www.umsu.ac.id
 E-mail : fl@umsu.ac.id
 labterpadufkumsu@umsu.ac.id
 Bankir : Bank Syariah Mandiri, Bank Bukopin, Bank Mandiri, Bank BNI 1946, Bank Sumut.

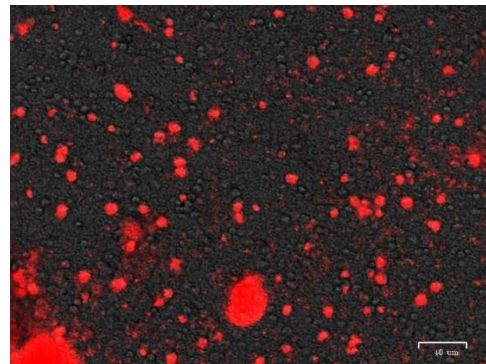


Lampiran 4. Hasil Penelitian

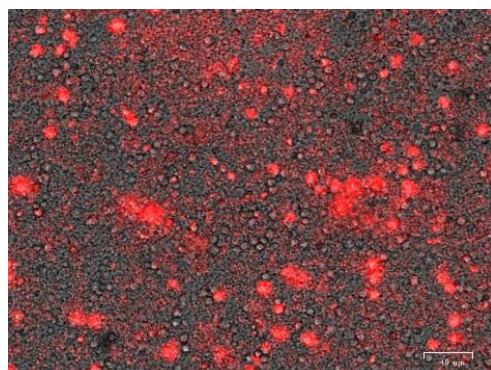


Konsentrasi 2 μM 

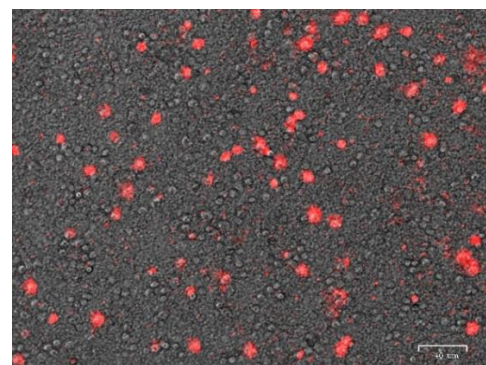
(1)

Konsentrasi 4 μM 

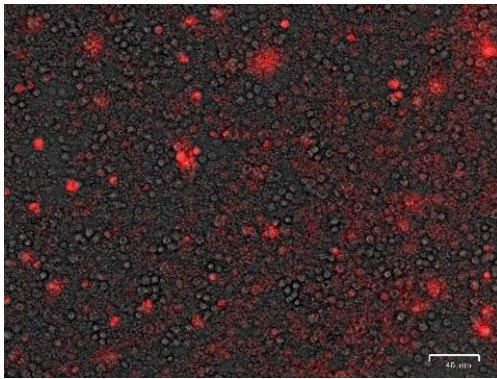
(1)



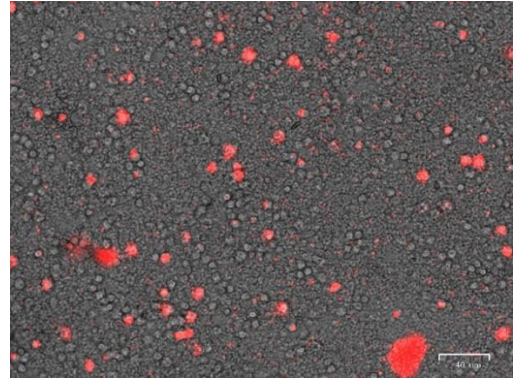
(2)



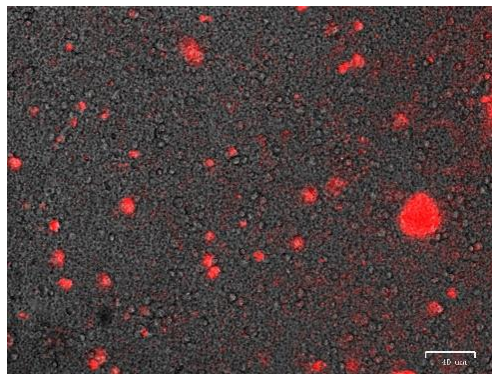
(2)



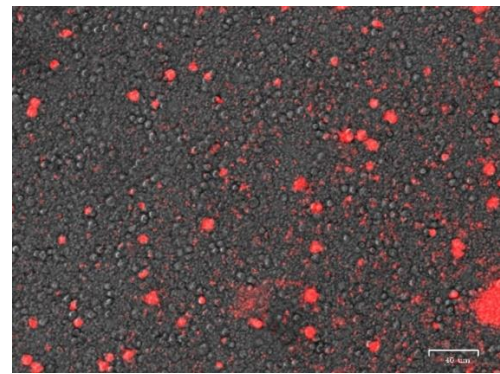
(3)



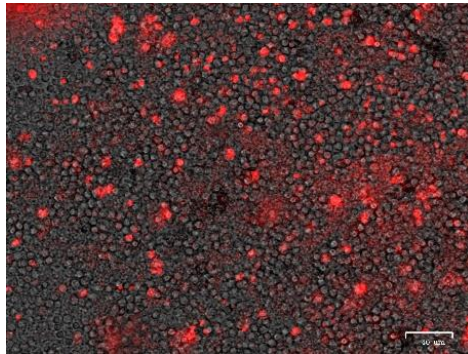
(3)



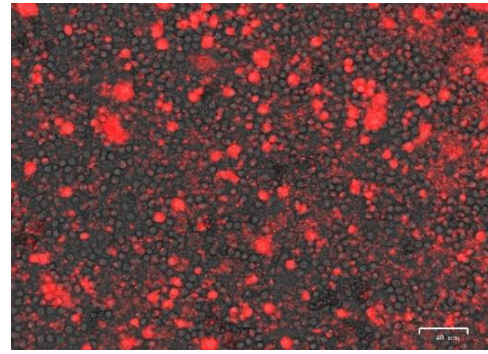
(4)



(4)



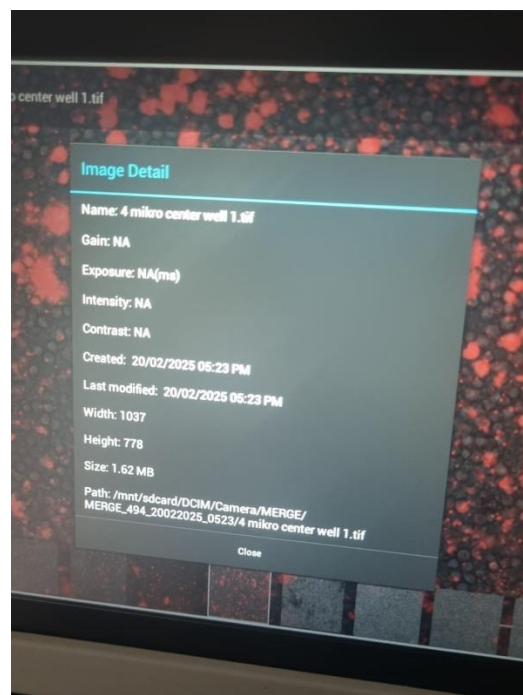
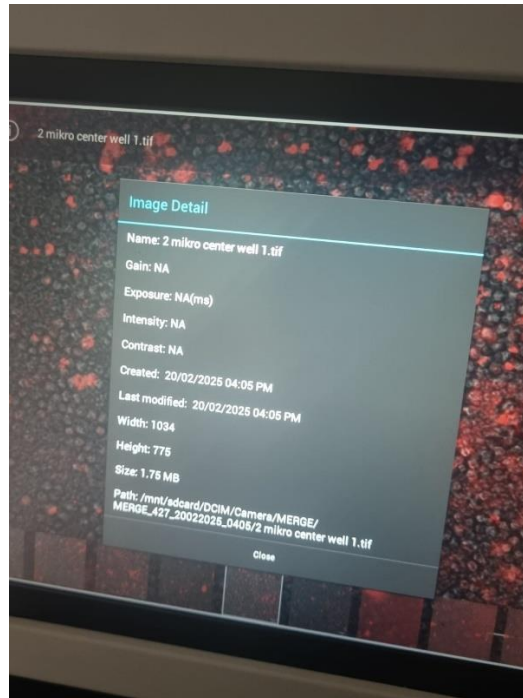
(5)



(5)

Keterangan:

- (1) = Lapang pandang atas
- (2) = Lapang pandang bawah
- (3) = Lapang pandang kiri
- (4) = Lapang pandang kanan
- (5) = Lapang pandang tengah



Timestamp Pemeriksaan JC-1 di Mikroskop Fluoresens

Lampiran 5. Hasil Uji Statistik

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
2 μ M	,284	3		,934	3	,503
4 μ M	,175	3		1,000	3	1,000

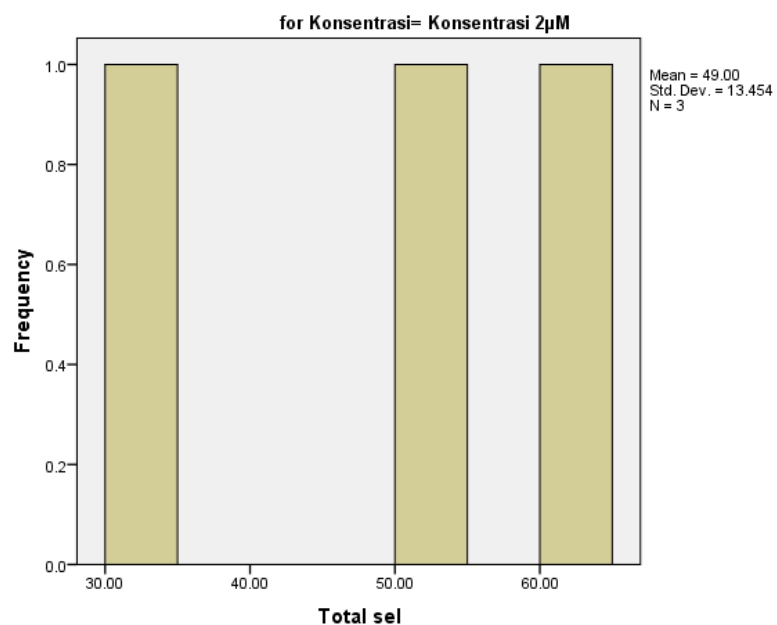
*. This is a lower bound of the true significance.

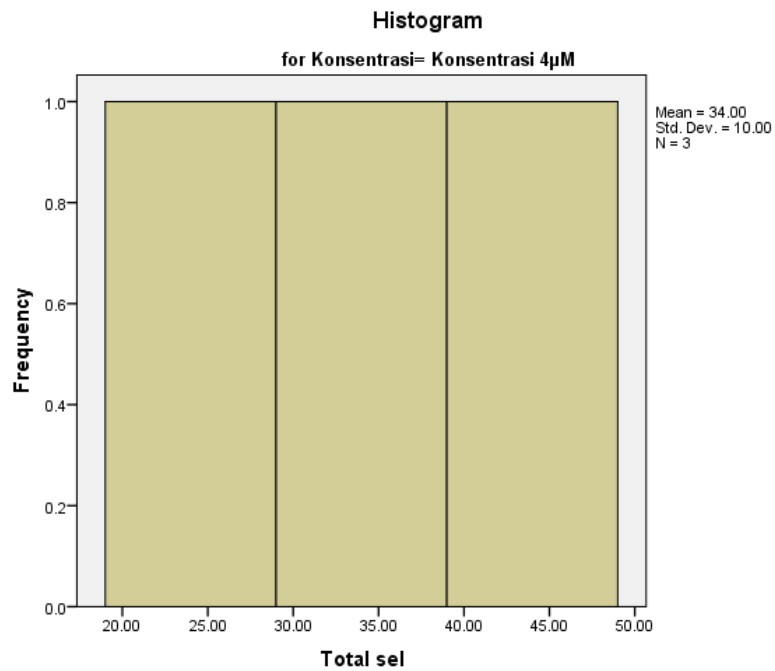
a. Lilliefors Significance Correction

Group Statistics

kelompok		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
hasil	2 μ M	3	49,0000	13,45362	7,76745
	4 μ M	3	34,0000	10,00000	5,77350

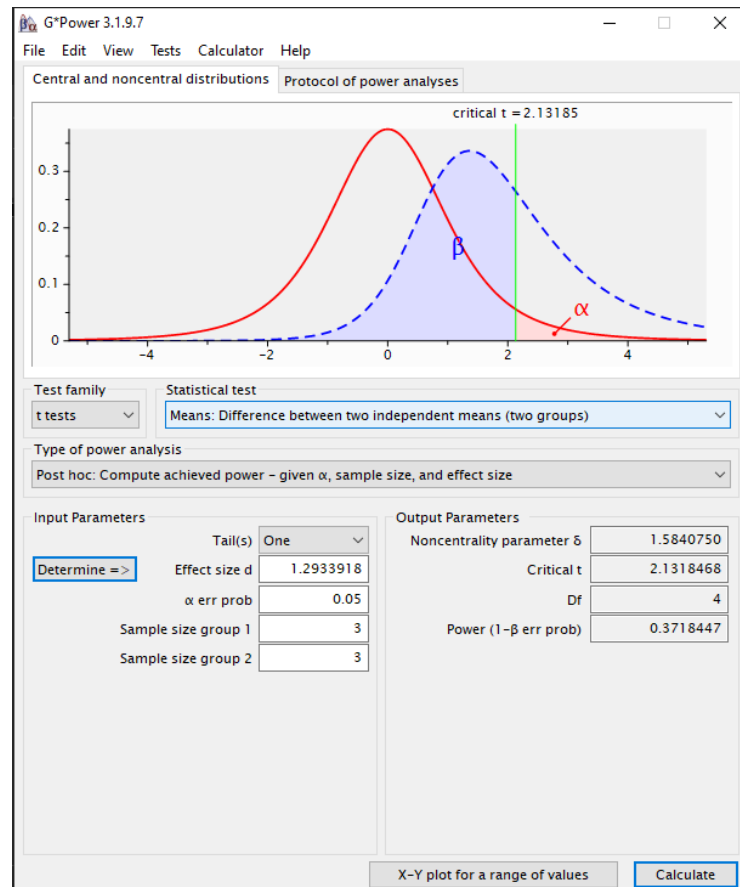
Histogram





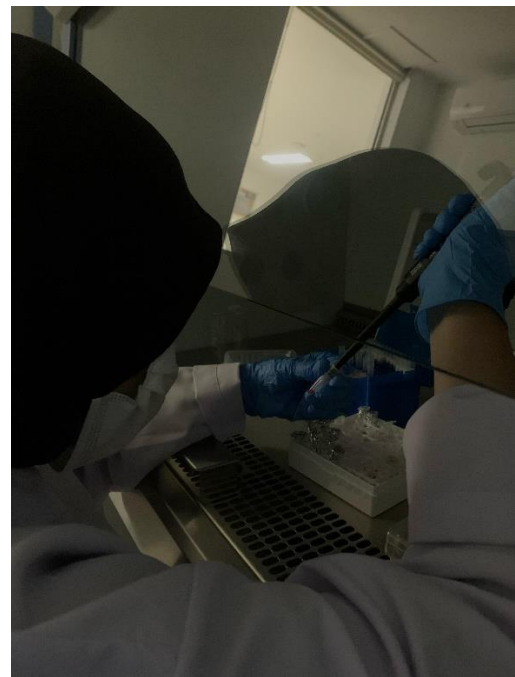
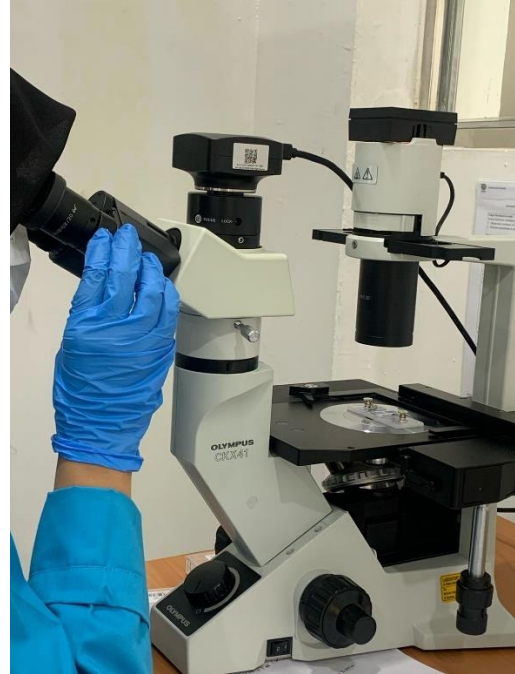
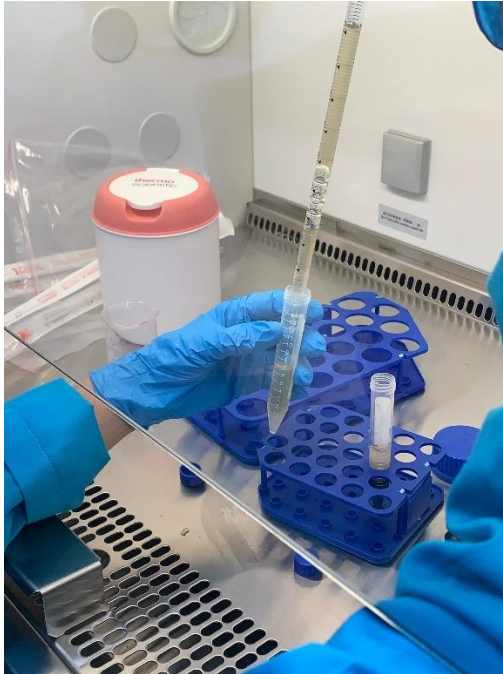
Independent Samples Test

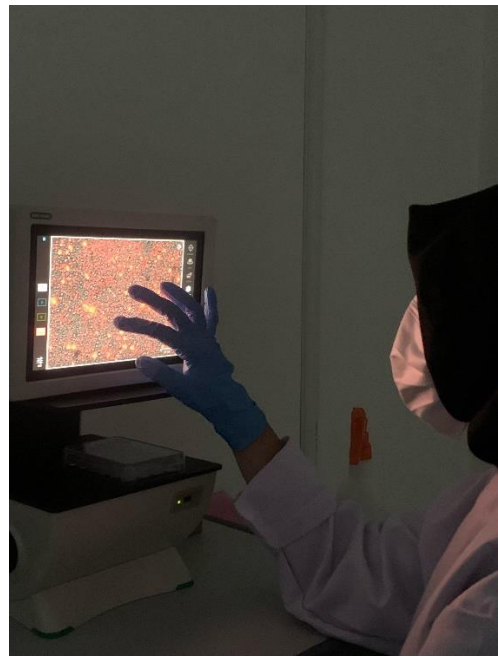
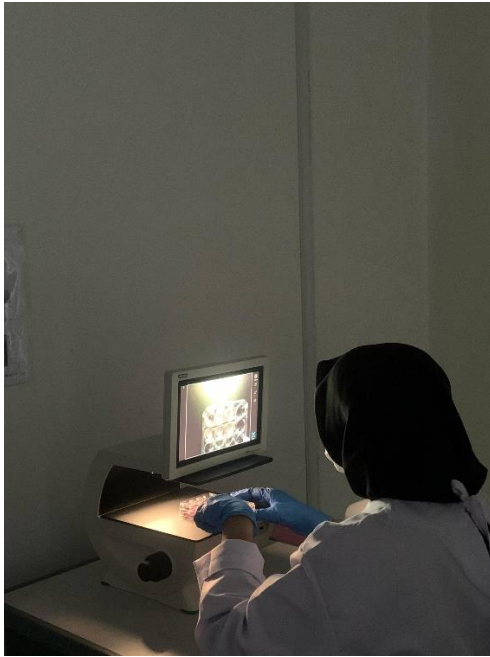
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
hasil	Equal variances assumed	,518	,511	1,550	4	,196	15,00000	9,67815	-11,87086	41,87086
	Equal variances not assumed			1,550	3,693	,202	15,00000	9,67815	-12,77474	42,77474



Hasil Uji Daya Analisis di *Gpower*

Lampiran 6. Dokumentasi Kegiatan

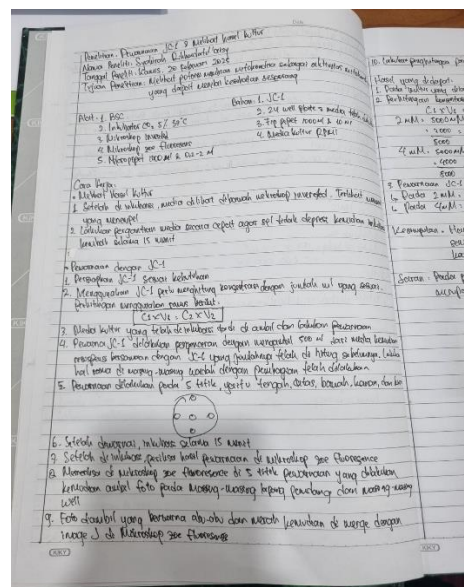
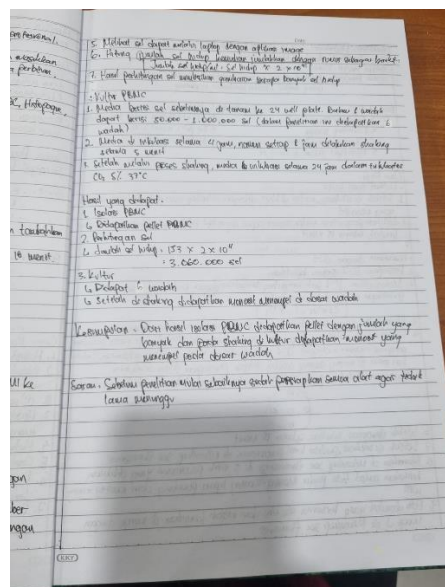
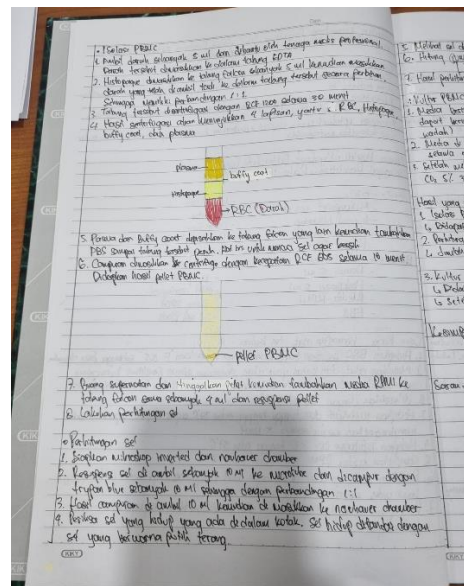
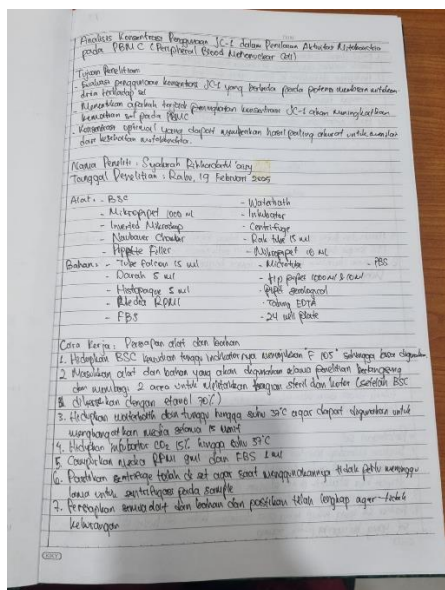


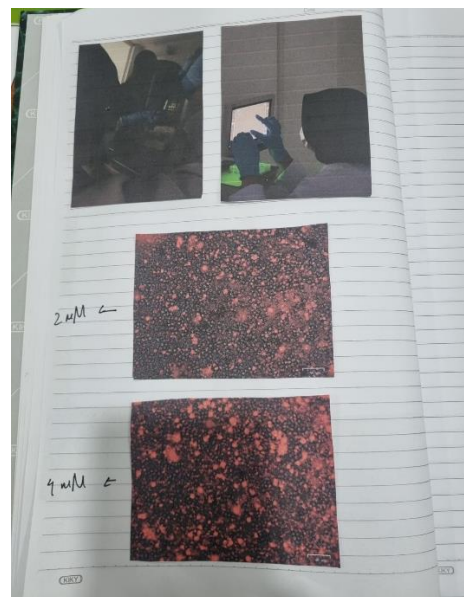
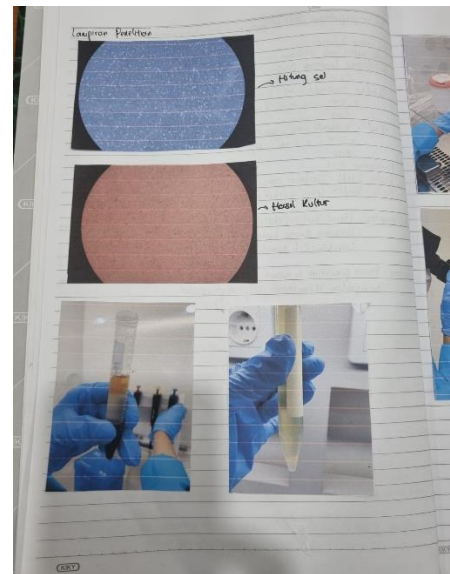
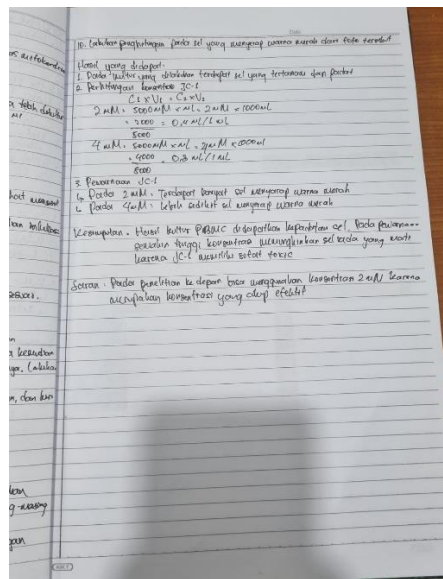


No	Tanggal Kunjungan	Nama	Awal Instansi	Jabatan	Tujuan	Tanda Tangan	Keterangan
88	06-02-2015	Agus Rudianto Al Shadi	FA UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
89	18-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Kemampuan Berpikir Kritis		
90	06-02-2015	Syahrul Pribadi/0109	FK UMSU	Mahasiswa S1	Kemampuan Berpikir Kritis		
91	11-2-2015	Dr. Ruzaidi I. Sani	Indonesian	Mahasiswa S2	Penelitian Biologi		
92	19-02-2015	Syahrul Pribadi	FK UMSU	Mahasiswa S2	Penelitian - Penelitian Pendidikan		
93	19-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
94	19-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
95	19-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
96	19-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
97	19-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
98	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
99	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
100	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
101	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
102	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
103	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
104	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
105	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
106	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
107	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
108	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
109	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
110	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
111	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
112	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
113	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
114	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
115	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
116	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
117	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
118	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
119	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		
120	20-02-2015	Latih Anich	FK UMSU	Mahasiswa S1	Melakukan penelitian		

No	Tanggal Kunjungan	Nama	Awal Instansi	Jabatan	Tujuan	Tanda Tangan	Keterangan
95	27 Februari 2015	Silfy Anisa / NIK	PT. BDO Tech (Indo)	Marketing	Pemahaman Produk		
96	10 / Maret / 2015	Dr. Ber Sugandi	Kurtologi	Baran	Baran		
97	13-3-2015	Fajar	FK UMSU	Mahasiswa	Penelitian Biologi		
98	13-03-2015	Syahrul Pribadi	FK UMSU	Mahasiswa S1	Penelitian Pendidikan		
99	14-3-2015	An RIZYAN	FK UMSU	Mahasiswa	Penelitian Pendidikan		

Laporan Kehadiran/Absensi di Laboratorium Terpadu FK UMSU





Logbook Penelitian di Laboratorium FK UMSU

Lampiran 7. Artikel Penelitian

ANALISIS KONSENTRASI PENGGUNAAN JC-1 DALAM PENILAIAN AKTIVITAS MITOKONDRIA PADA PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

Syakirah Rihhadatul'aisy¹, Zukhrofi Muzar²

Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara¹

Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara²

Penulis Korespondensi: Zukhrofi Muzar

zukhrofimuzar@umsu.ac.id, bayer.aisy@gmail.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Mitokondria merupakan organel penting yang berperan dalam produksi energi sel melalui proses fosforilasi oksidatif. Salah satu indikator fungsi mitokondria adalah potensi membran mitokondria, yang dapat dinilai menggunakan pewarna fluoresens JC-1. Sebagian besar penelitian menggunakan konsentrasi JC-1 sebesar 2 μ M, namun efektivitas konsentrasi lain seperti 4 μ M masih belum banyak dikaji, terutama pada sel PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*). Tujuan penelitian ini untuk menganalisis pengaruh penggunaan dua konsentrasi JC-1 (2 μ M dan 4 μ M) terhadap aktivitas mitokondria pada PBMC.

Metode: Penelitian ini merupakan analitik eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan menggunakan sampel darah dari donor sehat. Sel PBMC diisolasi, dikultur, lalu diberi perlakuan JC-1 dengan dua konsentrasi berbeda. Penilaian dilakukan dengan mikroskop fluoresens untuk menghitung jumlah sel yang menyerap warna merah sebagai indikator potensi membran mitokondria.

Hasil: Sel yang menyerap warna merah pada konsentrasi 2 μ M memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan 4 μ M (mean 49,00 vs 34,00), meskipun perbedaan tidak signifikan secara statistik ($p=0,196$). Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi 2 μ M cenderung lebih efektif dalam menilai potensi membran mitokondria pada PBMC. **Kesimpulan:** Konsentrasi JC-1 sebesar 2 μ M merupakan konsentrasi yang optimal dalam menilai potensi membran mitokondria pada PBMC.

Kata Kunci: JC-1, mitokondria, PBMC, konsentrasi JC-1

PENDAHULUAN

Tubuh memiliki sistem kekebalan tubuh sebagai pelindung dari segala komponen yang dapat menginfeksi tubuh sehingga menjadi sebuah penyakit. Di berbagai jenis sel sebagai sistem imun salah satunya adalah *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC). PBMC terdiri dari beberapa komponen didalamnya seperti limfosit, monosit dan makrofag.¹ PBMC merupakan sekumpulan sel inflamasi yang besar dan mudah untuk diperoleh sehingga dapat memberikan informasi terkait sistem kekebalan tubuh.²

Mitokondria menjadi penghasil energi pada sel yang membentuk energi melalui pembentukan adenosin trifosfat (ATP) dari fosforilasi oksidatif (OXPHOS)³. Mitokondria dengan sel imun memiliki keterkaitan karena mitokondria memproduksi ATP sebagai aktivitas sel, metabolisme energi dan respon terhadap infeksi ataupun imun. Pembentukan ATP pada mitokondria terjadi karena adanya potensi membran mitokondria.⁴

Pada penilaian aktivitas mitokondria atau potensi membran

mitokondria dapat menggunakan pewarnaan mitokondria. Mitokondria dapat diwarnai dengan beberapa pewarnaan, salah satunya JC-1.⁵ Pada pewarnaan mitokondria membutuhkan konsentrasi sebagai respons dari potensi membran mitokondria⁶. Terdapat akumulasi JC-1 pada mitokondria yang membentuk agregat J. Agregat J memberikan warna pada potensi membran mitokondria sehingga hal tersebut dapat mendeteksi bagaimana potensi dari potensi membran mitokondria.⁷ Pada sel yang sehat dengan potensi membran mitokondria yang normal, pewarna JC-1 akan memasuki dan terakumulasi di dalam mitokondria yang memiliki energi dan muatan negatif, dan secara otomatis membentuk agregat yang menghasilkan fluoresensi merah. Sebaliknya, pada sel yang tidak sehat atau mengalami apoptosis, pewarna JC-1 juga masuk ke dalam mitokondria namun dalam jumlah yang lebih sedikit karena bagian dalam mitokondria memiliki muatan yang kurang negatif akibat peningkatan permeabilitas membran

dan kehilangan potensial elektrokimia.⁸

Beberapa peneliti terdahulu telah melakukan penelitian terkait pewarnaan mitokondria dengan JC-1, namun sebagian besar penelitian menggunakan konsentrasi JC-1 sebesar 2 μ M. Sementara itu, terdapat penelitian lain menunjukkan penggunaan metode JC-1 pada PBMC dengan konsentrasi lebih dari 2 μ M.^{9,10} Maka dari itu, dilakukannya penelitian ini bertujuan untuk melihat optimasi dan penggunaan konsentrasi JC-1 khusus untuk PBMC. Selain itu, penelitian ini juga melihat penggunaan konsentrasi yang berbeda antara konsentrasi 2 μ M dengan 4 μ M serta menentukan konsentrasi yang tepat untuk melihat fungsi mitokondria.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analitik eksperimental dimana penelitian ini akan melihat kondisi pada potensi membran mitokondria setelah diberi JC-1 dengan konsentrasi yang berbeda yang akan menjadi penilaian terhadap fungsi mitokondria pada PBMC.

Prosedur penelitian diawali dengan pemilihan populasi yang akan menjadi pendonor yang memiliki darah sehat berasal dari vena dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel yang digunakan adalah populasi yang telah ditentukan dan terdiri dari sel-sel sehat yang telah di isolasi dari darah sehat. Penelitian ini berjalan selama 7 hari di Laboratorium Terpadu FK UMSU.

Kriteria inklusi berupa pendonor yang berusia di atas 18 tahun dan dalam keadaan sehat dan untuk kriteria eksklusi berupa pendonor memiliki riwayat penyakit darah dan memiliki indeks massa tubuh di atas nilai normal (obesitas). Seleksi sampel menggunakan *purposive sampling* karena menggunakan kriteria inklusi dan eksklusi.

Isolasi PBMC

Pengambilan sampel darah dilakukan *informed consent* terlebih dahulu kepada pendonor dan darah sehat di ambil dari vena sebanyak 5 ml menggunakan tabung vaculab EDTA. Darah di isolasi menggunakan reagen histopaque yang dilakukan dalam tabung 15 ml berisi *ficoll*

paque dengan perbandingan 1:1 dan sentrifugasi 30 menit. Hasil didapatkan 4 lapisan, yaitu RBC, *buffy coat*, *plasma*, dan darah. *Buffy coat* di ambil dengan hati-hati dan pindahkan ke tabung baru yang ditambah dengan PBS kemudian di sentrifugasi selama 10 menit. Didapatkan pellet PBMC dan dilakukan pencucian sel agar menjadi bersih. Kemudian PBMC dimasukkan di cryovial dan disimpan dalam freezer -80°C.¹¹

Thawing dan Perhitungan Sel

Setelah *freezing*, dilakukan thawing PBMC di waterbath pada suhu 37°C dan perhitungan sel. Perhitungan sel dilihat dengan cara menggunakan naubauer chamber yang telah dibersihkan dan dilihat menggunakan mikroskop inverted.¹¹ Suspensi sel dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge sebanyak 10µL dan campurkan dengan trypan blue sebanyak 10µL sehingga keduanya memiliki perbandingan 1:1. Campuran dipipetkan sebanyak 10µL ke dalam naubauer chamber dengan mikropipet dan 5 suspensi akan menyebar di dalam naubauer chamber. Amati menggunakan

mikroskop inverted kemudian sel di hitung dengan melihat sel yang hidup (sel berwarna cerah) dan sel mati (sel berwarna biru) serta melakukan penghitungan sel.¹²

$\text{Jumlah sel hidup/mL} = \text{Jumlah resuspensi (ml)} \times 2 \times 10^4$

Kultur PBMC

PBMC dikultur dalam *Complete Media* yang berisi RPMI yang telah dipanaskan di dalam waterbath pada suhu 37°C selama 15 menit dengan 10% FBS. Media di aduk secara perlahan sebanyak tiga kali. *Complete Media* RPMI dipipet sebanyak 1 mL ke dalam 24 well plate. PBMC di inkubasi pada suhu 37°C CO2 5%. PBMC di amati setelah 1 malam dengan mikroskop inverted.¹¹

Perhitungan Konsentrasi JC-1

Penggunaan JC-1 dilakukan pengukuran untuk mengencerkan larutan. Pengukuran dilakukan bertujuan untuk mendapatkan volume yang tepat dari konsentrasi yang berbeda. Sehingga konsentrasi yang didapatkan telah sesuai untuk digunakan saat melakukan pewarnaan pada sel PBMC. Perhitungan

dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:¹³

$$\text{Perhitungan} = C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Pewarnaan Mitokondria

Menggunakan JC-1

PBMC di kultur sesuai dengan protokol penelitian yang sedang dijalankan. Tambahkan JC-1 Staining solution per 500 μL condition media dengan konsentrasi yang ditentukan sebelumnya. Aduk perlahan dengan pipet *up and down*. Masukkan kedalam plate kultur. Inkubasi sampel CO_2 dalam inkubator 37°C selama 15 menit. Setelah di inkubasi amati sel dengan *zoe fluorescent cell imager*. Akan terlihat gambaran sel yang menyerap agregat berwarna merah.¹⁴

Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan data akan dilakukan menggunakan perangkat lunak komputer, yaitu *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Setelah data dikumpulkan dan diproses, langkah selanjutnya adalah menganalisis data. Jumlah sampel penelitian ditentukan berdasarkan perhitungan untuk uji beda dua rata-rata (*independent t-test*). Proses analisis data dimulai

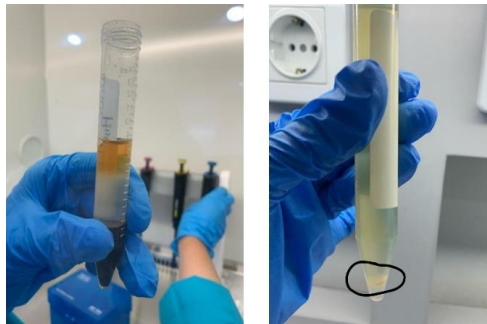
dengan analisis univariat untuk menilai distribusi dan karakteristik masing-masing variabel, seperti viabilitas dan sel PBMC yang telah diwarnai dengan JC-1 pada konsentrasi berbeda, dengan menghitung statistik deskriptif berupa rata-rata, median, standar deviasi, dan frekuensi. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menguji normalitas data. Jika data berdistribusi normal, digunakan uji *independent t-test*. Namun, apabila tidak berdistribusi normal, digunakan uji Mann-Whitney untuk membandingkan kelompok. Tingkat signifikansi yang digunakan adalah 5%. Jika $p < 0,05$ maka H_1 diterima (terdapat perbedaan signifikan), sedangkan jika $p > 0,05$ maka H_0 diterima (tidak terdapat perbedaan signifikan).

HASIL

Isolasi PBMC

Isolasi PBMC didapat melalui sampel darah yang di ambil dari donor sehat sebanyak 5 mL yang kemudian dilakukan menggunakan kit khusus untuk isolasi PBMC dan didapatkan 4 lapisan yang terdiri dari plasma, buffy coat, ficoll paque, dan RBC. Buffy coat di ambil kemudian

dilakukan pencucian sel dan menghasilkan pellet PBMC.



Gambar 1. Hasil Isolasi PBMC

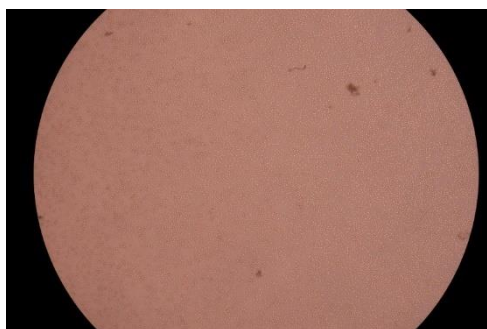
Perhitungan Sel Hidup

Perhitungan sel digunakan untuk melihat sel hidup dan jumlah dari sel hidup didapatkan sebanyak berikut: Jumlah sel hidup dalam kamar hitung = 153 sel

$$153 \times 2 \times 10^4 = 3.060.000 \text{ sel}$$

Kultur PBMC

Kultur PBMC dilakukan selama 24 jam. Hasil kultur didapatkan sel menempel pada permukaan well sehingga menggambarkan sel yang sehat dan aktif.



Gambar 2. Hasil Kultur PBMC

Pewarnaan Konsentrasi JC-1

Pada penelitian ini menggunakan JC-1 dengan volume 5 mg dan diencerkan untuk mendapatkan volume dari dua konsentrasi yang digunakan, yaitu 2 μM dan 4 μM , maka didapatkan perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 2 \mu\text{M}: & 5000 \mu\text{M} \times \mu\text{L} = 2 \\ & \mu\text{M} \times 1000 \mu\text{L} = 2000/5000 = 0,4 \\ & \mu\text{L}/1 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 4 \mu\text{M}: & 5000 \mu\text{M} \times \mu\text{L} = 4 \\ & \mu\text{M} \times 1000 \mu\text{L} = 1000/5000 = 0,8 \\ & \mu\text{L}/1 \text{ mL} \end{aligned}$$

Pewarnaan Mitokondria dengan JC-1

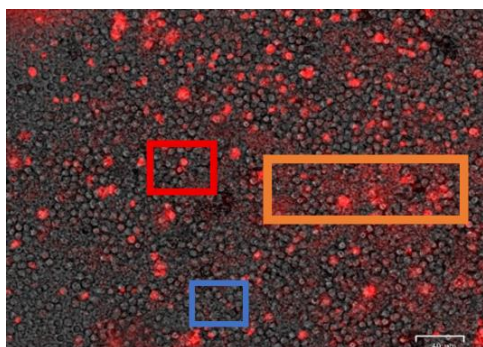
Pewarnaan mitokondria menggunakan JC-1 memberikan hasil bermakna bagi aktivitas mitokondria. Pewarnaan ini diperiksa menggunakan mikroskop fluoresens. Hasil yang didapatkan dari pewarnaan adalah terdapat sel yang menyerap warna merah. Sel yang menyerap warna merah dihitung di masing – masing well pada setiap konsentrasi. Sel yang didapatkan pada konsentrasi yang berbeda adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Sel Merah didapatkan dari Konsentrasi 2 μM

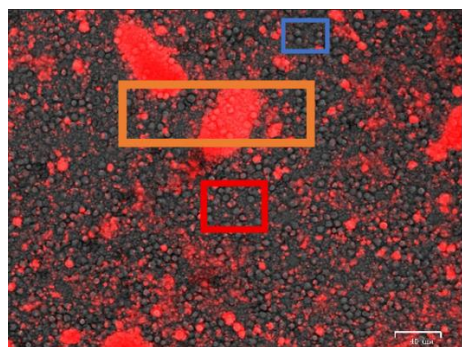
Well Plate	Sel Menyerap Merah
1	60
2	53
3	34

Tabel 2. Sel Merah didapatkan dari Konsentrasi 4 μM

Well Plate	Sel Menyerap Merah
1	34
2	44
3	24



Gambar 3. Hasil Pewarnaan dengan JC-1 Konsentrasi 2 μM



Gambar 4. Hasil Pewarnaan dengan JC-1 Konsentrasi 4 μM

Keterangan :

Kotak merah : Sel yang menyerap warna merah

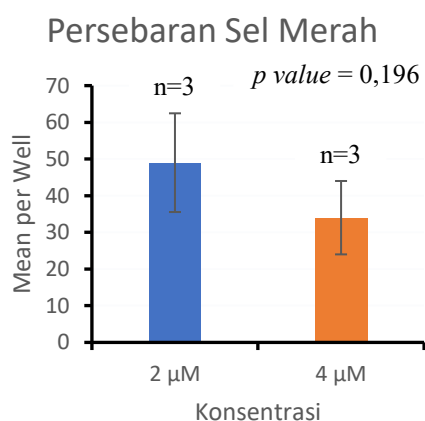
Kotak jingga : Warna merah tidak merata sehingga tidak bisa terhitung

Kotak biru : Sel yang tidak menyerap warna merah

Analisis Dana

Hasil data menunjukkan analisis terhadap dua konsentrasi, yaitu Konsentrasi 2 μM dan Konsentrasi 4 μM . Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai p dari kedua kelompok konsentrasi, yaitu pada konsentrasi 2 μM p (0,503) dan konsentrasi 4 μM p (1,000). Keduanya memiliki nilai $p > 0,05$ menandakan bahwa data terdistribusi secara normal. *Independent T Test* dilakukan untuk membandingkan jumlah JC-1 rata – rata per lapang pandang antara konsentrasi 2 μM dan konsentrasi 4 μM . Konsentrasi 2 μM memiliki mean sebesar 49,00 dan standar deviasi 13,454. Sebaliknya, Konsentrasi 4 memiliki mean 34,00 dan standar deviasi 10,00. Namun, pada perbedaan keduanya memiliki

statistik dengan signifikansi $p = 0,196$. Angka tersebut menunjukkan nilai sig. $p > 0,05$ sehingga didapatkan kedua kelompok tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Berdasarkan uji daya (*power*) pada penelitian ini didapatkan hasil sebesar 37% yang menggambarkan bahwa penelitian ini memiliki daya yang lemah.



Gambar 5. Grafik Persebaran Sel Merah Setiap Konsentrasi

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, secara pengamatan didapatkan sel yang menyerap agregat merah pada kelompok konsentrasi 2 µM lebih banyak dibandingkan kelompok konsentrasi 4 µM. Dalam penelitian ini menggunakan *zoe fluorescent cell imager* untuk melihat hasil dari

pewarnaan JC-1. Dalam mikroskop tersebut hanya menggunakan satu filter warna, yaitu warna merah saja dan pengukuran warna merah dan hijau tidak bisa dilakukan secara bersamaan dikarenakan kurang sensitif untuk menilai kondisi mitokondria sehingga hasil menjadi tidak maksimal.

Diketahui JC-1 adalah pewarna kationik yang diserap oleh mitokondria berkaitan langsung dengan tingkat potensi membran mitokondria. Semakin tinggi penyerapan mitokondria, semakin banyak konsentrasi bentuk agregat JC-1 yang menghasilkan sinyal emisi fluoresensi merah, dibandingkan dengan bentuk monomer JC-1 yang memancarkan fluoresensi hijau. Penilaian mitokondria juga dapat berdasarkan dari sel yang menyerap warna merah sehingga semakin banyak sel yang menyerap warna merah, potensi membran mitokondria bernilai lebih besar.¹⁵

Penggunaan JC-1 pada konsentrasi 2 µM dan 4 µM dalam penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan dalam viabilitas sel antara kedua konsentrasi

tersebut. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, kedua konsentrasi mungkin berada dalam rentang yang cukup untuk mencapai saturasi dalam pengukuran potensi membran mitokondria, sehingga tidak ada perbedaan yang terlihat. Selain itu, variabilitas dalam eksperimen, seperti perbedaan dalam kultur sel dan kondisi lingkungan, dapat mempengaruhi hasil. Respons sel terhadap JC-1 juga dapat bervariasi tergantung pada jenis sel yang digunakan, beberapa sel mungkin lebih sensitif terhadap perubahan konsentrasi, sementara yang lain tidak. Metode analisis yang digunakan untuk mengevaluasi data juga berperan penting analisis statistik yang tepat diperlukan untuk menentukan signifikansi perbedaan. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, seperti 4 μM , mungkin ada efek toksisitas yang dapat mempengaruhi viabilitas sel, sehingga mengimbangi potensi peningkatan sinyal fluoresensi. Maka dari itu, didapatkan tren penurunan jumlah sel merah antara konsentrasi 2 μM dan 4 μM .

Penelitian yang dilakukan oleh Figuiera *et al.*, 2012

menunjukkan bahwa konsentrasi JC-1 yang tinggi membuat endapan menjadi sulit dibersihkan.¹⁶ Hal ini menggambarkan pada penggunaan konsentrasi 4 μM pada pewarnaan cukup sulit di nilai karena banyak nya endapan yang ada pada sel sehingga cukup sulit menilai sel yang menyerap agregat merah.

Keterbatasan dari penelitian ini adalah kurangnya sampel pada penelitian. Hal ini dikarenakan merupakan penelitian terbaru sehingga mencoba untuk memulai dari sampel seminimal mungkin untuk melihat sejauh mana perbedaan awal antar kelompok perlakuan. Penelitian ini tidak dilakukan dengan teknik *blind* sehingga ditakutkan hasil bias. Kemudian masih banyaknya membutuhkan referensi tambahan mengenai penggunaan pewarna JC-1 karena masih jarang nya penelitian yang menggunakan konsentrasi pada JC-1 selain dari 2 μM .

KESIMPULAN

Sel yang menyerap agregat merah dapat menunjukkan potensi membran mitokondria yang lebih besar. Secara visual menunjukkan terdapat tren penurunan jumlah sel

merah antara konsentrasi 2 μ M dengan konsentrasi 4 μ M. Penggunaan konsentrasi yang lebih rendah dapat lebih optimal dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Namun, hasil analisis statistik menunjukkan bahwa konsentrasi 2 μ M dengan 4 μ M tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pourahmad J, Salimi A. Isolated human peripheral blood mononuclear cell (PBMC), a cost effective tool for predicting immunosuppressive effects of drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res*. 2015;14(4):679-980.
2. Sen P, Kemppainen E, Orešič M. Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Front Mol Biosci*. 2018;4(JAN):1-11. doi:10.3389/fmolb.2017.00096
3. Tiwari-Heckler S, Robson SC, Longhi MS. Mitochondria Drive Immune Responses in Critical Disease. *Cells*. 2022;11(24):1-11
4. Creed S, McKenzie M. Measurement of mitochondrial membrane potential with the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM). *Methods Mol Biol*. 2019;1928:69-76.
5. Sakamuru S, Zhao J, Attene-Ramos MS, Xia M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. *Methods Mol Biol*. 2022;2474:11-19.
6. Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis*. 2012;3(11):1-7.
7. Elefantova K, Lakatos B, Kubickova J, Sulova Z, Breier A. Detection of the mitochondrial membrane potential by the cationic dye JC-1 in 11210 cells with massive overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1-14.
8. Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-protocol*. 2019;9(1):1-13.

9. Dell'Anna ML, Maresca V, Briganti S, Camera E, Falchi M, Picardo M. Mitochondrial impairment in peripheral blood mononuclear cells during the active phase of vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2001;117(4):908-913. doi:10.1046/j.0022-202X.2001.01459.x
10. Chiu HY, Tsao LY, Yang RC. Heat-shock response protects peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from hydrogen peroxide-induced mitochondrial disturbance. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(2):207-217.
11. Sapkota TDC and GP, Abstract. Characterization of Protein Complexes Using Chemical Cross-Linking Coupled Electrospray Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2016;(1341):257-284.
12. Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7(JUN).
13. Roy D. Chemistry for the environment. *React Polym*. 1994;23(2-3):263.
14. Abcam. ab113850 JC-1 – Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit. 2022;(10009172).
15. Takegawa R, Hayashida K, Murao A, et al. The role of homogenization cycles and Poloxamer 188 on the quality of mitochondria isolated for use in mitochondrial transplantation therapy. *Sci Rep*. 2025;15(1):3350.
16. Figueira TR, Melo DR, Vercesi AE, Castilho RF. Mitochondrial Bioenergetics. *Mitochondrial Bioenerg Methods Protoc (Methods Mol Biol vol 810)*. 2012;810:103-117.