

PERBANDINGAN PEWARNAAN JC-1 PADA PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) YANG DIKULTUR DENGAN MEDIA RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) DAN DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

SKRIPSI



UMSU
Unggul | Cerdas | Terpercaya

Oleh :

LUTHFI ARIQOH

2108260156

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
MEDAN
2025

PERBANDINGAN PEWARNAAN JC-1 PADA PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) YANG DIKULTUR DENGAN MEDIA RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) DAN DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran**



Oleh :

LUTHFI ARIQOH
2108260156

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Luthfi Ariqoh

NPM : 2108260156

Judul Skripsi : PERBANDINGAN PEWARNAAN JC-1 PADA PBMC
(*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) YANG DIKULTUR
DENGAN MEDIA RPMI (*Roswell Park Memorial Institute
Medium*) DAN DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

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

Medan, 30 Juli 2025



(Luthfi Ariqoh)

HALAMAN PENGESAHAN



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 : Luthfi Ariqoh
NPM : 2108260156
Judul : Perbandingan Pewarnaan JC-1 Pada (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)
Yang Dikultur Dengan Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) Dan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

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. Zukhrofi Muzan, M.Si Med., M.Sc., Ph.D)

NIDN: 0128068602

Penguji 1

(Dr. Yulia Fauziyah, M.Sc)

NIDN: 0423078703

Penguji 2

(dr. Isra Thristy, M.Biomed)

NIDN: 0118048505

Mengetahui,

Ketua Program Studi
Pendidikan Dokter FK UMSU



(dr. Siti Maslaha Siragar, Sp.THT-KL (K))

NIDN: 0106098201

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

NIDN: 0112098605

Ditetapkan di : Medan
Tanggal : 15 Juli 2025

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Allah Subahanahu Wata'ala karena berkat rahmat dan hidayah-Nya lah , penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Perbandingan Pewarnaan JC-1 pada PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) yang di Kultur dengan Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) dan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)” dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumater Utara.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari saat melakukan penelitian dan penulisan skripsi ini penulis dihadapkan dengan berbagai masalah dan hambatan, namun berkata dukungan serta bimbingan dari berbagai pihak alhamdulillah skripsi ini dapat diselesaikan. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THTBKL., Subsp.Rino(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
2. Dr. dr. Nurfadly, MKT selaku Wakil Dekan 1 FK UMSU
3. dr. Muhammad Edy Syahputra Nasution, M.Ked (ORL-HNS) Sp.THT-KL selaku Wakil Dekan 3 FK UMSU
4. dr. Desi Isnayanti, M.Pd.Ked selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter FK UMSU
5. dr. Zukhrofi Muzar, M.Si.Med., M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan, bimbingan dan masukan dalam penyusunan skripsi ini
6. Dr. Yulia Fauziyah, M.Sc selaku dosen penguji I dan dr. Isra Thristy, M.Biomed selaku dosen penguji II atas bimbingan dan arahan untuk penulisan skripsi yang lebih baik
7. Orang tua saya yaitu ayah Muhammad Idris, ibu saya almh. Hartati Nasution, adik saya Mardiyah, sepupu, dan keluarga saya yang sudah

memberi doa, cinta, serta bantuan dukungan moral dan material serta doa-doa yang tidak pernah putus

8. Semua dosen dan staf pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara yang sudah mengajar serta memberi bimbingan pada penulis
9. Teman-teman penulis, Syakirah, Azizi, Qnada, Marva, Kak kiki, dan semua orang-orang baik yang telah membantu, memberikan dukungan dan berjasa kepada penulis yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis semasa studi serta membantu penulis dalam menyelesaikan dan mengerjakan skripsi ini.

Penulis Menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu diharapkan adanya kritik dan saran yang membangun. Akhir kata, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada penulis dan pembaca, semoga Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Medan, 20 Juni 2025



Luthfi Ariqoh

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

**PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Luthfi Ariqoh

NPM : 2108260156

Fakultas : Kedokteran

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas skripsi saya yang berjudul:

“ Perbandingan Pewarnaan JC-1 Pada PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) Yang Dikultur Dengan Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) Dan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) ”

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak untuk menyimpan, mengolah dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya dalam berbagai format media dengan syarat nama saya sebagai penulis/pencipta dan pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Medan

Pada tanggal : 30 Juli 2025

Yang menyatakan



(Luthfi Ariqoh)

ABSTRAK

Latar Belakang: *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) sering digunakan dalam penelitian imunologi, toksikologi, dan onkologi. Aktivitas mitokondria merupakan indikator penting dalam menilai kesehatan sel PBMC, yang dapat diukur melalui pewarnaan JC-1. Pemilihan media kultur berpengaruh terhadap viabilitas dan fungsi sel. Penelitian ini bertujuan membandingkan efektivitas dua media kultur umum, RPMI 1640 dan DMEM, terhadap potensial membran mitokondria PBMC. **Metode:** Penelitian ini bersifat eksperimental analitik dengan desain *post test only control group*. Sampel PBMC diisolasi dari 5 mL darah vena manusia, dikultur dalam media RPMI dan DMEM selama 24 jam, lalu diberi pewarna JC-1. Pengamatan dilakukan pada lima titik lapangan pandang setiap well menggunakan mikroskop fluoresensi ZOE. Analisis data mencakup uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji *Independent T-Test*. **Hasil:** Jumlah sel PBMC hidup sebanyak 3 juta sel diperoleh dari 5 mL darah. Setelah dikultur, sel dalam kondisi baik dan menempel di permukaan well. Hasil pewarnaan JC-1 menunjukkan aktivitas mitokondria yang baik pada kedua media, dengan kecenderungan fluoresensi merah lebih tinggi pada RPMI. Namun, uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara kedua kelompok ($p = 0,072$). Nilai power statistik sebesar 0,45, menandakan kekuatan uji yang rendah. **Pembahasan:** Meskipun hasil tidak signifikan secara statistik, RPMI menunjukkan potensi mendukung mitokondria PBMC lebih baik dibandingkan DMEM. Namun, DMEM tetap efektif digunakan, khususnya untuk kultur jangka pendek dan lebih ekonomis. **Kesimpulan:** Baik RPMI maupun DMEM mampu mempertahankan aktivitas mitokondria PBMC. DMEM dapat menjadi alternatif apabila RPMI tidak tersedia, khususnya dalam konteks penelitian jangka pendek.

Kata kunci: DMEM, JC-1, PBMC, potensial membran mitokondria, RPMI

ABSTRACT

Background: *Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) are widely used in immunology, toxicology, and oncology research. Mitochondrial activity is an important indicator of PBMC health and can be measured using JC-1 staining. The choice of culture media influences cell viability and function. This study aims to compare the effectiveness of two commonly used culture media, RPMI 1640 and DMEM, on the mitochondrial membrane potential of PBMCs.* **Methods:** *This was an analytical experimental study with a post-test only control group design. PBMC samples were isolated from 5 mL of human venous blood, cultured in RPMI and DMEM media for 24 hours, and stained with JC-1. Observations were made at five different microscopic fields per well using a ZOE fluorescence microscope. Data analysis included the Shapiro-Wilk normality test and Independent T-Test.* **Results:** *A total of 3 million viable PBMCs were obtained from 5 mL of blood. After culturing, the cells were in good condition and adhered to the well surface. JC-1 staining showed good mitochondrial activity in both media, with a higher red fluorescence tendency in RPMI. However, statistical analysis showed no significant difference between the two groups ($p = 0.072$). The statistical power was 0.45, indicating low test strength.* **Discussion:** *Although not statistically significant, RPMI showed a tendency to better support mitochondrial activity in PBMCs compared to DMEM. Nevertheless, DMEM remains effective, particularly for short-term culture and is more cost-efficient.* **Conclusion:** *Both RPMI and DMEM can maintain PBMC mitochondrial activity. DMEM may serve as an alternative when RPMI is unavailable, especially in short-term research contexts.*

Keywords: *DMEM, JC-1, PBMC, mitochondrial membrane potential, RPMI*

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vii
ABSTRAK	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 PBMC	5
2.1.1 Definisi PBMC	5
2.1.2 Peran PBMC	5
2.1.3 Monosit dan Mitokondria	6
2.1.4 Potensial Membran Mitokondria.....	8
2.1.5 Sumber PBMC.....	8
2.1.6 Keunggulan PBMC.....	9
2.1.7 Isolasi PBMC.....	9
2.1.8 Faktor yang Memengaruhi Kualitas Mitokondria Sel PBMC	10

2.2 Kultur Sel PBMC	13
2.3 Media Kultur PBMC	13
2.3.1 Media RPMI	14
2.3.2 Media DMEM.....	15
2.3.3 Faktor yang Memengaruhi Kultur Sel	16
2.3.4 Aplikasi Kultur PBMC	17
2.4 JC-1 <i>Staining</i>	18
2.4.1 Definisi JC-1 <i>Staining</i>	18
2.4.2 Penilaian JC-1 <i>Staining</i>	18
2.4.3 Faktor yang Memengaruhi Hasil JC-1 <i>Staining</i>	19
2.5 Kerangka Teori.....	21
2.6 Kerangka Konsep.....	22
2.7 Hipotesa.....	22
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	23
3.1 Definisi Operasional.....	23
3.2 Jenis Penelitian.....	23
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian.....	24
3.5 Kriteria Sampel Penelitian	24
3.5.1 Inklusi.....	24
3.5.2 Eksklusi.	24
3.6 Prosedur Penelitian	24
3.6.1 Alat.....	25
3.6.2 Bahan.....	25
3.6.3 Pengambilan Sampel	26
3.6.4 Perhitungan Sel.....	27
3.6.5 Kultur PBMC.....	28
3.6.6 JC-1 <i>Staining</i>	29
3.7 Teknik Pengumpulan Data.....	29
3.7.1 Pengolahan Data	30

3.7.2 Analisa Data.....	30
3.8 Alur Penelitian	32
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Hasil Penelitian.....	33
4.1.1 Hasil Isolasi PBMC	33
4.1.2 Hasil Perhitungan Sel PBMC	34
4.1.3 Hasil Kultur PBMC	35
4.1.4 Hasil Pewarnaan Mitokondria dengan JC-1 pada Kultur PBMC	35
4.1.5 Analisis Data Pewarnaan JC-1	37
4.2 Pembahasan	38
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1. Definisi Operasional.....	23
Tabel 4. 1. Jumlah Sel Berfluoresensi Merah dari Media RPMI	36
Tabel 4. 2. Jumlah Sel Berfluoresensi Merah dari Media DMEM.....	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Ilustrasi Hasil Isolasi PBMC	10
Gambar 2. 2. JC-1 membentuk agregat fluoresensi merah saat mitokondria sehat	18
Gambar 2. 3. Kerangka Teori	21
Gambar 2. 4. Kerangka Konsep	22
Gambar 3. 1. Alur Penelitian.....	32
Gambar 4. 1. Hasil isolasi PBMC	33
Gambar 4. 2. Hasil pewarnaan sel dengan <i>trypan blue</i>	34
Gambar 4. 3. Hasil kultur PBMC dengan Media,	35
Gambar 4. 4. Hasil Pewarnaan dengan JC-1	36
Gambar 4. 5. Grafik Rata-Rata Jumlah Sel PBMC Berfluoresensi Merah.	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	47
Lampiran 2. Surat Peminjaman Lab Terpadu.....	48
Lampiran 3. Surat Keterangan Selesai Penelitian	49
Lampiran 4. Hasil Isolasi PBMC	50
Lampiran 5. Analisis Data Perhitungan Sel dengan <i>Trypan Blue</i>	51
Lampiran 6. Hasil Kultur PBMC	52
Lampiran 7. Hasil Pewarnaan JC-1 pada Kultur PBMC.....	53
Lampiran 8. <i>Timestamp</i> Pemeriksaan JC-1 di Mikroskop Fluoresensi.....	54
Lampiran 9. Analisis Data Pewarnaan JC-1 (Hasil SPSS).....	55
Lampiran 10. Dokumentasi Kegiatan	57
Lampiran 11. Artikel Publikasi	62
Lampiran 12. Biodata Penulis	70

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penelitian di bidang biomedis, khususnya dalam cabang imunologi, toksikologi, dan onkologi, sering menggunakan sel darah manusia yang dikultur di luar tubuh (*in vitro*). Salah satu jenis sel darah yang sering digunakan adalah *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC), yaitu kumpulan sel imun yang terdiri dari limfosit dan monosit.¹ Kultur PBMC memiliki peran penting dalam berbagai penelitian yang bertujuan untuk mengetahui respons imun, uji toksisitas obat, dan mekanisme dari beberapa jenis penyakit seperti infeksi, alergi, dan penyakit autoimun. Agar PBMC tetap hidup dan mampu menjalankan fungsinya selama dikultur, pemilihan media kultur yang tepat menjadi hal yang sangat penting dalam perancangan suatu eksperimen.²

Media kultur berfungsi sebagai lingkungan buatan yang menyediakan nutrisi, buffer pH, dan kondisi ionik yang mendukung metabolisme dan viabilitas sel. Dua jenis media yang paling umum digunakan dalam kultur sel PBMC adalah RPMI 1640 dan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Kedua media ini dikenal luas karena ketersediaannya, harga yang relatif ekonomis, serta kandungan nutrisinya yang dapat disesuaikan dengan kebutuhan berbagai jenis sel. Namun demikian, belum banyak penelitian yang secara langsung membandingkan efektivitas kedua media ini terhadap aktivitas mitokondria PBMC, terutama dilihat dari parameter penting seperti potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$).³

RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) biasa digunakan untuk sel-sel darah seperti limfosit, media ini punya pH sekitar 8 yang sedikit lebih tinggi dari media kultur lainnya serta menggunakan sistem penyangga bikarbonat untuk menjaga kestabilan pH. RPMI cocok digunakan untuk sel yang tumbuh melayang (suspensi) maupun menempel (monolayer). Dalam hal ini, limfosit merupakan jenis sel yang berada dalam suspensi dan tidak menempel pada

permukaan wadah kultur, sedangkan monosit menunjukkan kecenderungan alami untuk menempel pada dasar permukaan kultur. Media ini sudah sering dipakai dalam berbagai penelitian, seperti kultur limfosit yang baru diambil dari darah, menyatukan dua sel berbeda dalam teknik fusi sel, memproduksi antibodi melalui kultur sel hybridoma serta studi imunologi lain karena kemampuannya dalam mempertahankan viabilitas PBMC.⁴

Berbeda dengan RPMI, DMEM awalnya diformulasikan untuk kultur sel embrio tikus, namun kini banyak digunakan untuk berbagai jenis sel mamalia. Kandungan glukosa tinggi dalam DMEM (4.500 mg/L) terbukti optimal untuk menunjang pertumbuhan banyak jenis sel. Meskipun tidak secara khusus dirancang untuk sel imun, DMEM tetap dapat digunakan untuk PBMC dengan penyesuaian tertentu terutama dalam konteks sel yang menempel (sel adheren) seperti sel HeLa, fibroblast, dan dalam penelitian ini monosit.⁵ Penelitian oleh Shuran Gong dkk. membandingkan berbagai media kultur dalam mendukung respons imun PBMC. Hasilnya menunjukkan bahwa RPMI memiliki kecenderungan memberikan viabilitas sel yang lebih tinggi dibandingkan DMEM dalam kondisi tertentu. Meskipun DMEM bukan media khusus untuk PBMC, studi tersebut menilai bahwa DMEM tetap memiliki potensi apabila digunakan sebagai media kultur jangka pendek kurang dari 3 hari seperti dalam penelitian ini yang melakukan perbandingan efektivitas antara media RPMI dengan DMEM melalui pewarnaan JC-1 selama 24 jam untuk memantau aktivitas mitokondria. Oleh karena itu, penting untuk menilai performa antara media RPMI dan DMEM dalam kultur PBMC karena masing-masing punya kelebihan tergantung pada tujuan kultur.⁶

Kualitas dan fungsi PBMC tidak hanya dipengaruhi oleh media kultur, tetapi juga oleh berbagai faktor lain seperti usia donor, kondisi kesehatan, metode isolasi, faktor lingkungan tempat kultur dilakukan, serta kondisi mitokondria yang dikenal sebagai "pembangkit tenaga" sel. Mitokondria tidak hanya berperan dalam memproduksi energi (ATP), tetapi juga berperan penting dalam mengatur sinyal imun. Kesehatan mitokondria penting dalam mendukung aktivitas fisiologis dan imunologis PBMC yang dapat dilihat

menggunakan indikator potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$) melalui pewarnaan JC-1 sebagai pewarna kationik yang membedakan kondisi mitokondria berdasarkan polaritas membran.⁷

Pada mitokondria yang sehat JC-1 membentuk agregat merah, dalam konteks menjaga fungsi mitokondria perbandingan media kultur RPMI dan DMEM yang memiliki perbedaan komposisi terhadap pewarnaan JC-1 pada PBMC dapat memberikan gambaran yang lebih spesifik mengenai bagaimana media tersebut memengaruhi $\Delta\Psi_m$ dan kesehatan fungsi mitokondria sel PBMC.⁸

Melalui penelitian ini, diharapkan bisa diketahui media mana yang lebih baik dalam menjaga kesehatan mitokondria PBMC, dengan pewarnaan JC-1 sebagai indikator visual $\Delta\Psi_m$. Hasil dari penelitian ini diharapkan bisa membantu dalam merancang eksperimen yang lebih efektif dan juga memberi gambaran awal untuk penggunaan media kultur sel dalam terapi sel imun atau aplikasi medis lainnya di masa mendatang.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbandingan antara media kultur RPMI 1640 dan DMEM dalam mempengaruhi potensial membran mitokondria PBMC ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan potensial membran mitokondria PBMC yang di kultur menggunakan media RPMI dan DMEM.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh media kultur RPMI terhadap pewarnaan JC-1 sebagai indikator dari potensial membran mitokondria PBMC.
2. Mengetahui pengaruh media kultur DMEM terhadap potensial membran mitokondria PBMC.
3. Menentukan media kultur yang memberikan kondisi optimal untuk mempertahankan kesehatan mitokondria PBMC berdasarkan hasil pewarnaan JC-1.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Bagi peneliti, hasil penelitian ini diharapkan membantu peneliti memperluas pengetahuan ilmiah tentang media yang sesuai digunakan untuk PBMC serta mendapat wawasan baru dalam menilai potensial membran mitokondria melalui PBMC.
2. Bagi akademisi dan praktisi kesehatan, dapat memberikan pengetahuan mengenai media kultur sel yang sesuai untuk PBMC sehingga hasil penelitian yang dilakukan semakin efektif serta sebagai bahan referensi atau sumber informasi untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 PBMC

2.1.1 Definisi PBMC

PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) adalah sel darah putih dengan inti bulat dan tunggal, termasuk dalam kelompok leukosit agranulosit. Sel darah putih terdiri dari dua kelompok utama: agranulosit (mononuklear) yang tidak memiliki granula mencolok, dan granulosit (polimorfonuklear) yang mengandung granula. Komponen PBMC terdiri dari limfosit 70-90%, monosit 10-20%, dan sel dendritik 1-2%. Sistem kekebalan tubuh sebagian besar dibentuk oleh PBMC, yang mencakup limfosit, monosit, dan sel dendritik. Limfosit yang terdiri dari limfosit B dan T, memberikan perlindungan melalui mekanisme imun spesifik. Limfosit B menghasilkan antibodi untuk menandai patogen, sedangkan limfosit T menyerang sel target secara langsung dan berperan dalam mendeteksi dan menghancurkan sel tumor serta berfungsi mengoordinasikan respons imun dengan mengenali antigen yang disajikan oleh sel penyaji antigen seperti makrofag. Sementara itu, Monosit berfungsi sebagai fagosit dan dapat berdiferensiasi menjadi makrofag atau sel dendritik, yang penting dalam memproses dan menyajikan antigen kepada sel T. Dengan demikian, PBMC merupakan komponen esensial dalam sistem pertahanan tubuh terhadap alergi, infeksi (bakteri, virus, jamur), dan penyakit autoimun. PBMC juga digunakan sebagai sampel dalam teknologi sel tunggal untuk penelitian dasar, evaluasi terapeutik dalam uji klinis, dan perawatan klinis, guna menyelidiki respons imun terhadap rangsangan tertentu.⁹

2.1.2 Peran PBMC

PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) memiliki peran didalam tubuh manusia sebagai berikut, PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) terdiri dari sel darah putih atau leukosit yang berfungsi melindungi tubuh dari benda asing yang merugikan. Monosit

dan limfosit merupakan jenis leukosit yang memiliki peran berbeda namun saling melengkapi dalam sistem imun. Untuk mendukung fungsi sel tersebut dibutuhkan *Adenosine Triphosphate* (ATP) yang dihasilkan mitokondria sebagai pusat produksi energi dalam sel.¹⁰ Fungsi mitokondria sangat penting terutama untuk bertahan hidup selama penyakit kritis, tetapi dapat terganggu oleh berbagai faktor, mengakibatkan penurunan produksi energi (ATP) dan peningkatan kadar laktat. Nutrisi yang memadai selama dan setelah penyakit kritis dapat memperbaiki fungsi mitokondria, berkontribusi pada hasil fisik dan neurokognitif yang lebih baik di masa depan.¹¹

PBMC merupakan sumber yang banyak digunakan dalam penelitian untuk mengevaluasi fungsi mitokondria karena terdiri dari berbagai jenis sel imun, termasuk limfosit dan monosit, yang memiliki jalur metabolik berbeda serta merupakan komponen darah yang mudah diakses dan diisolasi memungkinkan penelitian yang praktis mengenai fungsi mitokondria. Penilaian mitokondria dari PBMC memiliki relevansi klinis, memberikan wawasan berharga dalam pemantauan respons terapi, evaluasi kesehatan secara keseluruhan, dan identifikasi biomarker untuk berbagai penyakit.¹²

2.1.3 Monosit dan Mitokondria

Monosit dapat berkembang menjadi makrofag setelah memasuki jaringan karena fungsinya sebagai fagosit besar yang memberikan perlindungan awal dengan memfagosit mikroorganisme dan menghasilkan kemotaksin serta sitokin termasuk bakteri dan debris seluler untuk memicu respons imun lebih lanjut. Fungsi sel ini sangat bergantung pada energi yang dihasilkan oleh mitokondria sebagai pusat produksi energi dalam sel yang menyediakan ATP sehingga kesehatan mitokondria penting dalam menjaga efektivitas sistem imun serta memastikan bahwa PBMC dapat menjalankan fungsinya dengan optimal.¹³

Mitokondria merupakan organel penting dalam sel yang dikenal sebagai “pembangkit tenaga sel” karena perannya dalam menghasilkan energi berupa *Adenosine Triphosphate* (ATP) melalui proses fosforilasi oksidatif (OXPHOS). Fungsi mitokondria tidak hanya terbatas sebagai penghasil energi, tetapi juga berperan dalam pengaturan kadar ion kalsium di dalam sel, produksi serta pembuangan spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*/ROS), dan proses kematian sel terprogram (apoptosis). Mitokondria terdapat di hampir semua sel eukariotik, termasuk sel imun seperti monosit. Dalam monosit, energi yang dihasilkan mitokondria berperan penting untuk mendukung berbagai fungsi imun, seperti fagositosis, pemrosesan antigen, dan aktivasi sistem imun bawaan. Oleh karena itu, keberadaan dan kesehatan mitokondria sangat berpengaruh terhadap efektivitas respon imun seluler.¹⁴ Aktivitas mitokondria dalam PBMC berperan penting dalam aktivasi, diferensiasi, dan produksi molekul efektor imun. Misalnya, pada sel T yang teraktivasi, terjadi pergeseran metabolisme dari fosforilasi oksidatif ke glikolisis aerobik untuk memenuhi kebutuhan energi yang lebih tinggi.¹⁵

Fungsi mitokondria dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor internal dan eksternal. Sebagai pembangkit tenaga sel, mitokondria menghasilkan ROS sebagai produk sampingan dari respirasi seluler. Dalam kondisi fisiologis, produksi ROS dikendalikan oleh sistem pertahanan antioksidan seluler. Namun, jika produksi ROS meningkat secara berlebihan dan melebihi kapasitas detoksifikasi sel oleh karena paparan asap rokok, polusi, penyakit metabolik (seperti diabetes dan kanker), proses inflamasi, kekurangan nutrisi antioksidan, dan gangguan dalam dinamika mitokondria, maka akan terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif dapat merusak struktur mitokondria, termasuk membran, enzim, dan DNA mitokondria (mtDNA), yang pada akhirnya menyebabkan disfungsi sel dan kematian sel.¹⁶

2.1.4 Potensial Membran Mitokondria

Salah satu indikator penting dari fungsi mitokondria adalah Potensial Membran Mitokondria (*Mitochondrial Membrane Potential*/MMP). Penurunan MMP biasanya mengindikasikan kerusakan fungsi mitokondria dan sering dikaitkan dengan inisiasi proses kematian sel terprogram (apoptosis). Sebaliknya, MMP yang terlalu tinggi juga dapat memicu peningkatan produksi ROS yang bersifat merusak. Oleh karena itu, pemantauan MMP menjadi salah satu parameter kunci dalam menilai kesehatan mitokondria.⁷ Menurut Li et al., disfungsi mitokondria berkontribusi terhadap berbagai penyakit sistemik, termasuk diabetes, obesitas, Alzheimer, dan Parkinson. Hal ini berkaitan dengan peran mitokondria dalam metabolisme, inflamasi, dan imunitas, di mana pelepasan mtDNA dapat mengaktifasi jalur inflamasi seperti NLRP3 dan STING1. Kerusakan pada proses seperti dinamika mitokondria, mitofagi (autofagi khusus mitokondria), dan biogenesis mitokondria turut memperparah disfungsi sel secara keseluruhan.¹⁷

2.1.5 Sumber PBMC

PBMC diambil dari darah vena karena dindingnya yang lebih tipis, tekanan darah yang lebih rendah, dan kemudahan dalam menghentikan perdarahan. Sampel diambil dari fossa antekubital di siku anterior dan biasanya dikumpulkan dalam tabung khusus yang mengandung antikoagulan seperti K2EDTA. Konsentrasi PBMC bervariasi menurut usia, dengan individu yang lebih muda memiliki konsentrasi lebih tinggi, umumnya berkisar antara $0,5-3 \times 10^6$ sel/mL. Darah terdiri dari tiga elemen seluler: eritrosit, leukosit, dan trombosit, yang tersuspensi dalam plasma. Eritrosit menyusun lebih dari 99% total sel darah, dengan nilai hematokrit rata-rata 42% untuk wanita dan 45% untuk pria. Sel darah putih dan trombosit tidak berwarna dan memiliki kepadatan lebih rendah dibandingkan eritrosit. Dengan sentrifugasi gradien densitas tinggi, sel darah dapat dipisahkan berdasarkan kepadatan, membentuk lapisan-lapisan, di mana lapisan "*Buffy coat*"

yang terdiri dari trombosit dan leukosit terletak di antara eritrosit dan plasma.¹³

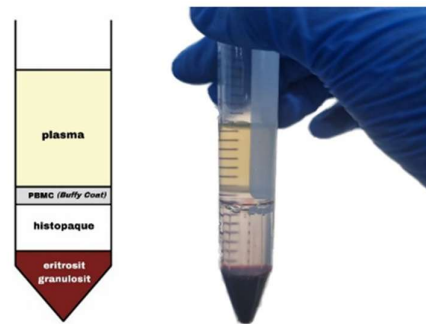
2.1.6 Keunggulan PBMC

Keunggulan PBMC meliputi proses pengambilan yang minim invasif, tanpa memerlukan anestesi atau terapi immunosupresif jangka panjang, sehingga tidak menimbulkan konflik etis. Keunggulan lain yang membuatnya diminati dalam penelitian imunologi adalah karena dapat dipisahkan dan diisolasi dengan teknik sederhana seperti sentrifugasi gradien kepadatan. Selain itu, PBMC dapat disimpan dalam jangka panjang melalui kriopreservasi dengan suhu rendah menggunakan nitrogen cair atau *Mr. Frosty* yang diisi dengan larutan isopropanolol kemudian diletakkan pada (-80°C) sehingga dapat bertahan lama. Proses ini memungkinkan PBMC untuk digunakan sebagai sumber yang dapat diandalkan untuk berbagai eksperimen dalam waktu yang lama.¹⁸

2.1.7 Isolasi PBMC

Isolasi PBMC adalah langkah penting dalam persiapan sampel, pertama kali dijelaskan pada tahun 1968 dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas tinggi untuk memisahkan PBMC dari granulosit, trombosit, dan eritrosit. Media gradien densitas yang umum digunakan adalah *Ficoll-Paque* dan *Histopaque-1077*, yang murah namun memerlukan teknik manual yang melelahkan dan ketelitian tinggi untuk menghindari kontaminasi. Keduanya digunakan sebagai larutan gradien densitas untuk memisahkan sel-sel berdasarkan kepadatan mereka, khususnya dalam konteks pemisahan sel mononuklear darah perifer (PBMC) dari komponen darah lainnya. *Ficoll* dan *Histopaque* memiliki fungsi dan aplikasi yang serupa dalam pemisahan sel berdasarkan kepadatan. *Histopaque* memiliki kepadatan yang lebih tinggi (1.077 g/mL) yang memungkinkan pemisahan yang lebih efisien antara sel-sel mononuklear dan komponen darah lainnya. Seiring waktu, teknik isolasi alternatif telah dikembangkan untuk menyederhanakan prosedur dan mengurangi risiko kontaminasi, seperti penggunaan tabung

berpori yang memisahkan larutan gradien densitas dengan sampel darah, contohnya *Cell Preparation Tubes* (CPT) dan tabung *Sepmate*.¹⁸ Penelitian oleh Grievink et al., menunjukkan bahwa meskipun *Ficoll-Paque* manual lebih ekonomis, *Sepmate* dan CPT lebih mudah digunakan, meskipun risiko kontaminasi eritrosit tetap ada, terlihat dari jumlah sel yang lebih tinggi pada isolasi dengan CPT dibandingkan *Sepmate* dan *Ficoll*. Meskipun CPT dan *Sepmate* lebih mahal, tidak ada perbedaan signifikan dalam viabilitas sel antara semua metode isolasi tersebut.¹⁹



Gambar 2. 1. Ilustrasi Hasil Isolasi PBMC

Metode isolasi PBMC menggunakan prinsip migrasi diferensial sel darah melalui media polimer selama sentrifugasi. Prosedurnya melibatkan pencampuran sampel darah antikoagulan dengan medium *Ficoll/Histopaque*, diikuti dengan sentrifugasi. Sel darah merah dan granulosit yang lebih berat mengendap di dasar tabung, sementara PBMC mengapung di antarmuka antara medium dan lapisan plasma/platelet. Hasilnya, terbentuk empat lapisan. Lapisan plasma dan trombosit di atas, lapisan PBMC di tengah, dan lapisan eritrosit serta granulosit di bawah. Sel-sel PBMC kemudian dipanen dan dicuci untuk menghilangkan kontaminan sebelum analisis lebih lanjut.²⁰

2.1.8 Faktor yang Memengaruhi Kualitas Mitokondria Sel PBMC

Kualitas mitokondria sel PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk usia individu, kondisi kesehatan, metode isolasi, serta faktor lingkungan dan

nutrisi. Seiring bertambahnya usia, kualitas dan jumlah mitokondria cenderung menurun, perubahan fisiologis, termasuk penurunan produksi sel imun. Perubahan ini berdampak pada menurunnya efektivitas sistem imun dalam merespons infeksi dan gangguan lainnya. Ketidakseimbangan antara proses fusi dan fisi mitokondria, serta akumulasi ROS, mempercepat penuaan sel dan penurunan fungsi organ.¹⁷

Berbagai kondisi kesehatan seperti infeksi, peradangan kronis, dan gangguan autoimun dapat memengaruhi jumlah dan kualitas PBMC. Infeksi dapat menyebabkan aktivasi berlebihan sel imun, sedangkan gangguan autoimun dapat menyebabkan kerusakan pada sel imun itu sendiri. Dalam kondisi patologis seperti sepsis, mitokondria mengalami stres oksidatif yang signifikan, yang ditandai dengan penurunan aktivitas respirasi dan gangguan integritas struktural. Mekanisme lain seperti peningkatan spesies nitrogen reaktif (RNS), gangguan proses mitofagi (penghilangan mitokondria rusak), serta perubahan membran mitokondria juga turut berkontribusi terhadap penurunan fungsi mitokondria.²¹

Peningkatan indeks massa tubuh (IMT) terbukti berkaitan dengan turunnya fungsi mitokondria terutama pada jaringan lemak putih (*white adipose tissue*) yang berperan penting dalam metabolisme energi tubuh. Menurut WHO rentang IMT normal berada di antara 18,5 hingga 24,9 kg/m² dan obesitas jika $IMT \geq 30$ kg/m². Gangguan pada mitokondria salah satunya disebabkan oleh obesitas. Obesitas didefinisikan sebagai kelebihan berat badan berdasarkan klasifikasi WHO pada usia dewasa terbagi menjadi Kelas I (30-34,9), Kelas II (35-39,9), dan Kelas III (lebih dari 40).²² Pada individu dengan IMT di atas kisaran normal, mitokondria akan mengalami penurunan kemampuan menghasilkan energi, jumlah mitokondria yang lebih sedikit, serta berkurangnya aktivitas gen penting yang berfungsi dalam pembakaran lemak dan produksi energi. Kondisi ini menyebabkan gangguan

metabolik seperti resistensi insulin dan stres oksidatif, yang juga berhubungan dengan kualitas mitokondria sel PBMC.²³

Metode isolasi sel PBMC juga berperan penting, karena teknik yang tidak tepat, seperti penggunaan reagen yang tidak sesuai atau teknik sentrifugasi yang kasar, dapat menyebabkan kerusakan sel dan mengurangi jumlah sel yang dapat digunakan untuk penelitian atau terapi. Paparan radikal bebas, yang dihasilkan dari berbagai sumber seperti polusi, asap rokok, dan proses metabolisme normal, dapat mempengaruhi kesehatan sel limfosit, menyebabkan stres oksidatif yang merusak membran sel dan mengganggu fungsi sel imun.²⁴

Selain faktor patologis, status nutrisi juga berpengaruh terhadap fungsi mitokondria. Kekurangan nutrisi seperti protein, zinc, dan selenium dapat mengganggu kerja mitokondria fungsi sel imun dan kualitas PBMC, sementara kelebihan antioksidan seperti zat besi dan vitamin C juga berisiko mempercepat kerusakan sel. Ketidakseimbangan metabolisme glukosa, misalnya akibat hiperglikemia, dapat menurunkan efisiensi produksi energi mitokondria dan berdampak pada integritas organel tersebut. Oleh sebab itu, keseimbangan asupan nutrisi menjadi aspek penting dalam menjaga fungsi mitokondria yang optimal, baik dalam kondisi sehat maupun saat pemulihan dari penyakit.²⁵

Terakhir, kondisi lingkungan seperti temperatur dan kelembapan selama penyimpanan dan transportasi sel dapat mempengaruhi viabilitas dan kualitas sel PBMC, di mana suhu yang tidak sesuai dapat menyebabkan denaturasi protein dan kerusakan sel, sementara kelembapan yang tinggi dapat meningkatkan risiko kontaminasi mikroba.²⁶

Dengan memahami faktor-faktor ini, langkah-langkah dapat diambil untuk meminimalkan dampak negatif terhadap kualitas sel PBMC, sehingga meningkatkan efektivitas penggunaannya dalam penelitian dan terapi.

2.2 Kultur Sel PBMC

Kultur sel PBMC adalah proses penanaman sel mononuklear dari darah perifer, seperti limfosit dan monosit, dalam lingkungan yang mendukung kelangsungan hidup sel-sel tersebut. Untuk pertumbuhan sel yang optimal, diperlukan kondisi lingkungan yang tepat, termasuk suhu yang terkontrol, substrat untuk perlekatan sel, serta media pertumbuhan yang sesuai yang menjaga pH dan osmolalitas.²⁷ Kultur PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) memerlukan media kultur sel yang menyediakan lingkungan optimal untuk kelangsungan hidup, perbanyakan, dan diferensiasi sel. Media ini harus mampu menyediakan sumber energi, oksigen, komposisi garam, pH yang stabil, serta menghilangkan sisa metabolit dan debris sel, sehingga berfungsi sebagai alternatif lingkungan alami bagi sel yang dikultur. Komponen-komponen ini memiliki fungsi spesifik, seperti sistem penyangga yang menjaga pH media, biasanya menggunakan sistem penyangga alami (CO₂/bikarbonat) atau HEPES, serta garam anorganik yang membantu mempertahankan keseimbangan osmotik dan mengatur potensial membran. Asam amino berfungsi sebagai blok bangunan protein yang esensial untuk proliferasi sel, sementara karbohidrat menjadi sumber utama energi, umumnya dalam bentuk glukosa. Protein dan peptida, yang penting dalam media bebas serum, termasuk albumin dan transferrin, juga berkontribusi pada pertumbuhan sel. Selain itu, vitamin diperlukan untuk pertumbuhan dan proliferasi sel, dan elemen jejak dibutuhkan dalam jumlah kecil untuk proses biologis yang penting.²⁸

2.3 Media Kultur PBMC

Media kultur dapat dibedakan menjadi beberapa kategori, yaitu media alami yang terdiri dari cairan biologis alami meskipun memiliki reproduksibilitas yang buruk, dan media buatan yang mengandung nutrisi yang ditambahkan secara sintetik. Media buatan ini dibagi menjadi media yang mengandung serum, yang menggunakan serum sapi janin sebagai suplemen umum untuk menyediakan nutrisi dan faktor pertumbuhan, media bebas serum yang dirancang untuk mendukung kultur sel tertentu tanpa serum, media yang ditentukan secara kimiawi yang mengandung bahan ultra murni dan aditif

protein, serta media bebas protein yang hanya mengandung konstituen non-protein.²⁸

Beberapa media kultur yang sering digunakan meliputi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), yang kaya akan asam amino dan vitamin serta digunakan untuk berbagai jenis sel. RPMI-1640, yang merupakan media umum untuk sel hematopoietik dan dikembangkan untuk kultur limfosit. *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), yang merupakan media non-kompleks yang sering diperkaya dengan serum. Ham's F-12, yang mendukung pertumbuhan berbagai jenis sel, termasuk sel epitel dan fibroblast, serta *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), yang merupakan media yang sangat diperkaya untuk kultur sel dengan kepadatan tinggi. Berbagai jenis sel, seperti sel kanker, fibroblast, dan makrofag, memerlukan media spesifik seperti *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), RPMI-1640, dan Ham's F12-K Medium. Fitur penting dalam media kultur meliputi substrat untuk adhesi dan proliferasi, oksigen untuk respirasi, serta pH optimal antara 7,0 dan 7,4. Buffer dan karbon dioksida juga diperlukan untuk menjaga keseimbangan pH. Selain itu, optimasi media memerlukan pertimbangan terhadap konsentrasi nutrisi, keseimbangan pH, osmolalitas, sistem penyangga, dan kondisi inkubasi dalam mencegah kontaminasi dan meningkatkan proliferasi sel. Dalam penelitian ini, media yang digunakan untuk kultur PBMC adalah RPMI dan DMEM.⁴

2.3.1 Media RPMI

RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) adalah media kultur sel yang awalnya dikembangkan untuk kultur sel leukemia manusia dan telah terbukti efektif untuk berbagai jenis sel mamalia, termasuk sel darah perifer (PBMC), sel T, sel B, HeLa, Jurkat, dan MCF-7. Media ini mengandung 20 jenis asam amino, yang merupakan blok bangunan protein. Selain itu, RPMI 1640 juga mengandung berbagai vitamin yang diperlukan untuk metabolisme sel, glukosa disediakan sebagai sumber energi utama bagi sel dengan konsentrasi 1,8-2,2 g/L cukup untuk mendukung pertumbuhan, sementara

kandungan fosfat yang lebih tinggi berperan penting dalam metabolisme sel dan membantu menjaga keseimbangan pH. Media ini menggunakan natrium bikarbonat sebagai buffer untuk mempertahankan pH fisiologis sekitar 7,2 hingga 7,4 sangat penting untuk menjaga lingkungan yang stabil bagi sel selama kultur.²⁹

Meskipun RPMI 1640 memiliki komposisi yang baik, media ini tidak mengandung faktor pertumbuhan, lipid, atau protein yang diperlukan untuk beberapa jenis sel, sehingga sering kali diperlukan suplementasi, biasanya dengan menambahkan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), yang mengandung berbagai faktor pertumbuhan, hormon, dan nutrisi yang mendukung pertumbuhan dan viabilitas sel. RPMI 1640 sering digunakan untuk kultur sel imun, seperti sel darah perifer (PBMC), sel T, dan sel B, dan cocok untuk penelitian imunologi serta eksperimen yang memerlukan lingkungan yang lebih sederhana. Dengan komposisi yang mendukung metabolisme sel dan kebutuhan suplementasi yang jelas, RPMI 1640 menjadi pilihan yang baik untuk berbagai aplikasi dalam penelitian biologi sel. Namun dari segi biaya RPMI memiliki harga diatas DMEM.³⁰

2.3.2 Media DMEM

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) adalah media kultur sel yang dikenal lebih kaya nutrisi dibandingkan dengan RPMI 1640. Media ini mengandung 15 jenis asam amino, termasuk asam amino esensial yang penting untuk sintesis protein dan pertumbuhan sel. DMEM juga memiliki konsentrasi glukosa yang lebih tinggi, sekitar 4,5-4,95 g/L, yang menyediakan sumber energi yang lebih besar bagi sel. Selain itu, media ini mengandung berbagai vitamin dan mineral penting, seperti kalsium, magnesium, dan kalium, yang berkontribusi pada berbagai fungsi seluler. Sistem buffering DMEM lebih efektif, menggunakan natrium bikarbonat dan HEPES untuk menjaga stabilitas pH dalam rentang fisiologis (sekitar 7,2-7,4).

Stabilitas pH yang baik sangat penting untuk menciptakan kondisi optimal selama kultur sel.²⁹

Salah satu keunggulan DMEM adalah fleksibilitas dalam suplementasi, media ini dapat digunakan dengan atau tanpa serum, tergantung pada kebutuhan spesifik sel yang dikultur. DMEM juga dapat diformulasikan untuk mengandung faktor pertumbuhan tertentu, seperti *epidermal growth factor* (EGF) atau *fibroblast growth factor* (FGF), yang dapat meningkatkan pertumbuhan dan viabilitas sel. Media ini sering digunakan dalam penelitian biologi sel dan aplikasi bioteknologi yang memerlukan pertumbuhan sel yang optimal dan dukungan nutrisi yang lebih lengkap, selain itu pertimbangan biaya DMEM yang lebih murah dari RPMI juga menjadi pertimbangan untuk penggunaan media ini dalam penelitian.⁵

2.3.3 Faktor yang Memengaruhi Kultur Sel

Pemeliharaan kondisi aseptik dalam praktik kultur sel PBMC merupakan aspek yang sangat penting untuk menjamin keberhasilan eksperimen. Namun, terdapat berbagai faktor eksternal dan internal yang dapat meningkatkan risiko kontaminasi, yang pada gilirannya dapat merugikan hasil penelitian. Menjaga kondisi aseptik dalam kultur sel PBMC merupakan tantangan utama, dan berikut adalah risiko kontaminasi yang dapat muncul, prosedur sterilisasi yang tidak tepat, kontaminasi silang, Penanganan yang tidak benar, penggunaan alat yang sama tanpa disinfeksi, transfer sel yang tidak aseptis, kebersihan laboratorium yang buruk, sirkulasi udara yang tidak terjaga, serum dan reagen yang tidak steril atau terkontaminasi, penanganan sel yang ceroboh, kultur bersama tanpa pemisahan yang tepat.²⁶

Selain itu, terdapat beberapa masalah lain yang dapat mempengaruhi kultur PBMC, seperti, pertumbuhan sel yang lambat, karena penggunaan medium pertumbuhan yang tidak sesuai dengan kebutuhan jenis sel dan tidak mengandung serum yang disaring.

Penyimpanan medium yang salah juga dapat mempengaruhi pertumbuhan sel, sehingga penting untuk mengikuti petunjuk produsen dengan cermat. Tingkat CO₂ yang tidak tepat dapat mempengaruhi pH medium, periksa kultur secara berkala di bawah mikroskop untuk mendeteksi adanya kontaminasi. memantau kadar CO₂ dan suhu di inkubator, dan jangan biarkan sel di luar inkubator terlalu lama. Ganti medium kultur sel secara teratur untuk menghindari akumulasi toksin.³¹

2.3.4 Aplikasi Kultur PBMC

Kultur PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) memiliki berbagai aplikasi penting dalam penelitian kesehatan, terutama dalam bidang imunologi, onkologi, dan toksikologi. Kultur PBMC dapat digunakan untuk mempelajari bagaimana sistem kekebalan tubuh merespons infeksi, vaksin, patogen, yang membantu dalam pengembangan vaksin yang lebih efektif, menguji efektivitas dan keamanan vaksin dengan mengevaluasi respons sel T dan sel B terhadap antigen, mengidentifikasi biomarker terkait berbagai penyakit termasuk kanker dan penyakit autoimun dalam diagnosis dan prognosis. Dalam penelitian kanker, dapat mempelajari interaksi antara sel imun dan sel kanker yang penting untuk pengembangan terapi imun seperti terapi CAR-T. Pada penelitian toksikologi digunakan untuk menilai efek obat dan bahan kimia terhadap sel-sel imun, membantu menilai keamanan obat serta dapat dimodifikasi secara genetik untuk menghasilkan sel T yang digunakan dalam terapi sel, memberikan pendekatan baru dalam pengobatan kanker. Selain itu, kultur PBMC digunakan untuk memahami patogenesis penyakit autoimun dan respons imun terhadap penyakit menular, seperti HIV dan hepatitis. Secara keseluruhan, kultur PBMC merupakan alat yang sangat berharga dalam penelitian dan pengembangan terapi, memberikan wawasan mendalam tentang fungsi sistem kekebalan tubuh dan interaksinya dengan berbagai penyakit.³²

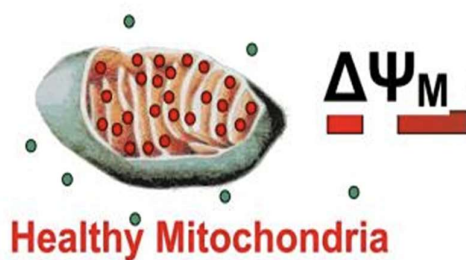
2.4 JC-1 Staining

2.4.1 Definisi JC-1 Staining

JC-1 (5,5', 6,6'- tetrakloro-1,1',3,3' - tetraetil – benzimidazolil karbositianin iodida) adalah pewarna kationik yang terakumulasi di mitokondria dalam hal ini mitokondria pada monosit sel-sel *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) dan berfungsi sebagai probe fluoresensi untuk menilai $\Delta\Psi$ mitokondria. JC-1 digunakan untuk memantau potensi membran mitokondria, memberikan indikasi kesehatan sel. Ketika diterapkan, JC-1 menunjukkan emisi pada panjang gelombang fluoresensi merah (590 nm) pada konsentrasi mitokondria yang tinggi, yang mencerminkan potensial mitokondria yang lebih tinggi. Dengan mengukur fluoresensi merah peneliti dapat menilai seberapa sehat mitokondria dalam PBMC, memberikan wawasan penting tentang fungsi sel dan respons imun.³³

2.4.2 Penilaian JC-1 Staining

Penilaian potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$) dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan pewarna JC-1. Pewarna ini bisa masuk ke dalam sel dan terkumpul di mitokondria. Jika mitokondria masih sehat dan berfungsi baik, JC-1 akan membentuk kumpulan (agregat) dan terlihat berwarna merah. Tapi kalau mitokondria sudah rusak atau tidak berfungsi normal, JC-1 akan tetap dalam bentuk tunggal (monomer). Seperti pada gambar berikut, terlihat perbedaan warna JC-1 pada mitokondria sehat. Mitokondria sehat menampilkan warna merah karena JC-1 membentuk kumpulan di dalamnya.³⁴



Gambar 2. 2. JC-1 membentuk agregat fluoresensi merah saat mitokondria sehat.⁷

Sel PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) yang sudah diberi JC-1 lalu diamati menggunakan mikroskop ZOE *Fluorescent Cell Imager*. Pengamatan dilakukan di lima bagian berbeda dalam satu sumur (*well*), kemudian dihitung berapa sel yang berwarna merah. Berdasarkan panduan dari Sivandzade et al., pengamatan JC-1 menggunakan mikroskop fluoresensi sudah bisa dianggap cukup baik jika dilakukan dengan cara yang konsisten. Salah satu cara untuk memastikan hasil yang akurat adalah dengan mengambil minimal 5 foto untuk tiap sampel. Walaupun mikroskop ZOE tidak secanggih mikroskop dua-foton atau konfokal, alat ini tetap cukup membantu untuk melihat warna merah dari JC-1.⁷

Selain itu, penelitian dari Sunoqrot et al., juga menggunakan JC-1 untuk melihat efek obat antikanker R7 dan R11 dalam bentuk nanopartikel. Setelah diberi obat, terjadi penurunan jumlah sel yang berwarna merah, menandakan bahwa mitokondria banyak yang rusak dan sel mengalami kematian (apoptosis). Mereka juga menggunakan mikroskop ZOE dalam pengamatannya dan mendapatkan hasil yang jelas.³⁵

Dari semua penelitian tersebut, bisa disimpulkan bahwa JC-1 adalah pewarna yang cukup baik untuk melihat perubahan potensial membran mitokondria. Pewarna ini bisa digunakan secara visual dengan mikroskop. Dalam penelitian ini, mikroskop ZOE dianggap cukup membantu untuk menilai aktivitas mitokondria pada sel PBMC berdasarkan warna yang muncul.

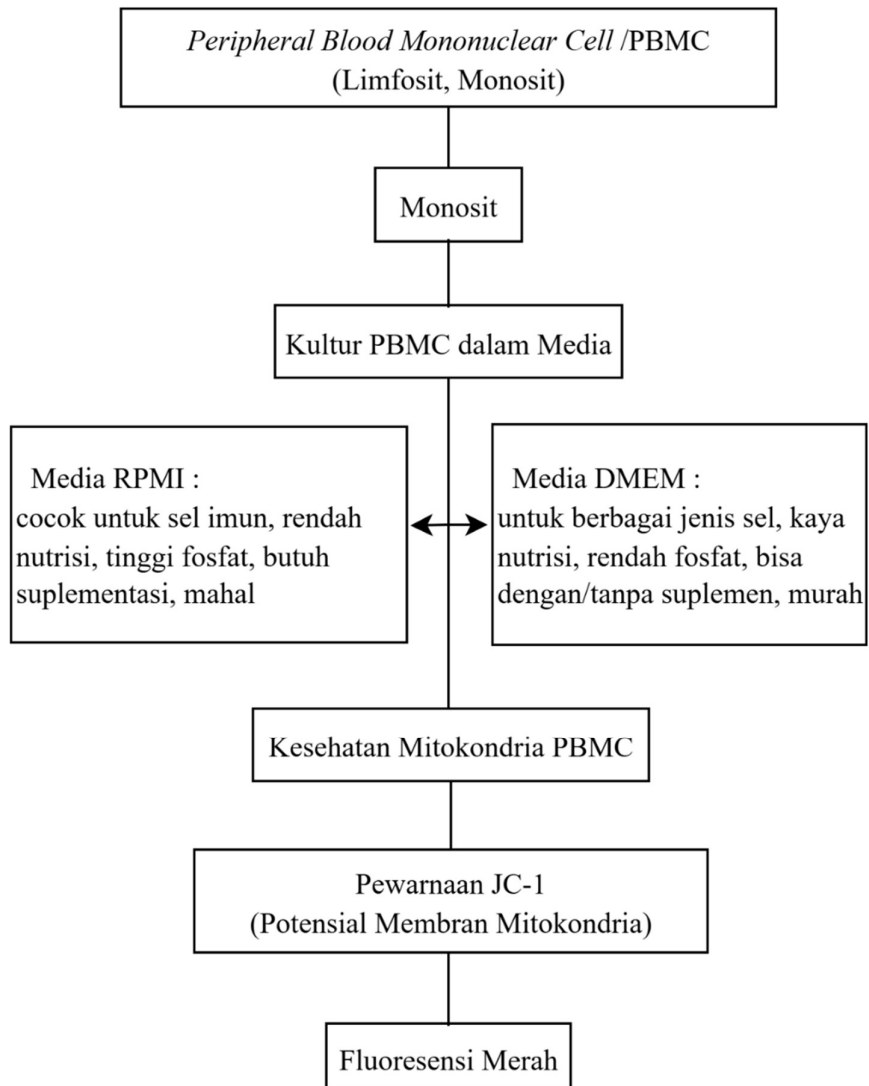
2.4.3 Faktor yang Memengaruhi Hasil JC-1 Staining

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 Jenis

sel yang digunakan dapat mempengaruhi hasil pewarnaan, karena karakteristik mitokondria berbeda antar jenis sel. Sebelum pewarnaan juga berperan penting dalam hasil yang diperoleh. Konsentrasi JC-1 yang tepat diperlukan untuk memastikan bahwa pewarnaan tidak terlalu rendah atau tinggi, yang dapat mempengaruhi rasio fluoresensi. Penggunaan konsentrasi yang tidak sesuai dapat menyebabkan sinyal yang tidak akurat. Konsentrasi JC-1 yang direkomendasikan adalah 2 μ M. Konsentrasi ini digunakan untuk mengevaluasi kesehatan sel serta fungsi mitokondria secara efektif.³⁷

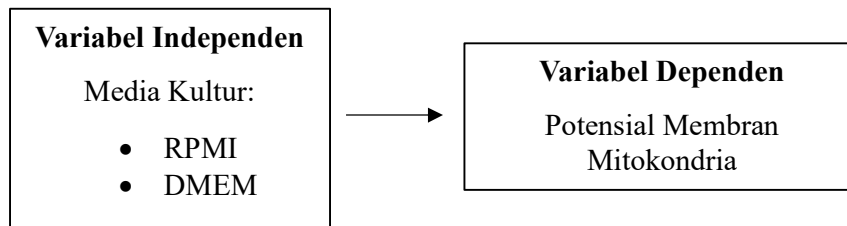
Durasi inkubasi dengan JC-1 harus dioptimalkan, waktu yang terlalu singkat dapat menghasilkan pewarnaan yang tidak memadai, sedangkan waktu yang terlalu lama dapat menyebabkan akumulasi yang tidak diinginkan. Waktunya adalah sekitar 15-30 menit. Waktu inkubasi yang ideal bervariasi tergantung pada jenis sel dan kondisi eksperimen. Perubahan dalam potensi membran mitokondria dapat mempengaruhi kemampuan JC-1 untuk membentuk agregat. Penurunan potensi membran sering kali menunjukkan stres seluler atau kerusakan mitokondria. Suhu lingkungan selama pewarnaan dapat mempengaruhi stabilitas JC-1 dan interaksinya dengan mitokondria. Keberadaan senyawa lain, seperti inhibitor atau senyawa yang mempengaruhi metabolisme sel, dapat mengubah hasil pewarnaan.⁷

2.5 Kerangka Teori



Gambar 2. 3 Kerangka Teori

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. 4. Kerangka Konsep

2.7 Hipotesa

1. H0 : Tidak terdapat perbedaan signifikan dalam potensial membran mitokondria PBMC yang di kultur menggunakan media RPMI dibandingkan dengan media DMEM.
2. H1 : Terdapat perbedaan signifikan dalam potensial membran mitokondria PBMC yang di kultur menggunakan media RPMI dibandingkan dengan media DMEM.

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Definisi Operasional

Tabel 3. 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Hasil	Skala ukur
Media Kultur: RPMI (Roswell Park Memorial Institutet) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Media kultur yang digunakan pada penelitian ini yaitu RPMI dan DMEM dengan volume 1000 μ L/well	Mikropipet	RPMI DMEM	Nominal
Potensial Membran Mitokondria	Sel mitokondria yang menyerap pewarna JC-1	Mikroskop fluoresensi ZOE	Jumlah sel yang menyerap pewarna JC-1	Rasio

3.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk eksperimental analitik dengan desain *experimental post test only control group*. Dalam penelitian ini digunakan metode penelitian perbandingan kelompok statistika (*statistical group comparison*), yaitu dengan pengukuran atau observasi yang dilakukan setelah kelompok perlakuan menerima intervensi menggunakan media kultur RPMI (Roswell Park Memorial Institutet) atau DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), dan juga pewarna kationik JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-

tetraetil-benzimidazolil karbositianin iodida). Hasil pengukuran tersebut untuk membandingkan efek kedua jenis media kultur terhadap variabel yang diukur, dengan pewarna kationik JC-1 yang digunakan sebagai indikator potensial membran mitokondria sel.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai dari 15 Februari hingga 21 Februari 2025. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara dan akan dilakukan sesuai dengan syarat dan standar dari laboratorium.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini terdiri dari 1 orang donor sehat sesuai kriteria inklusi dan eksklusi ditetapkan. Sampel yang digunakan adalah sel PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) dari 5 mL darah vena manusia. Dalam darah manusia, dengan perkiraan jumlah sel PBMC adalah sekitar 1,27 juta sel per mL.

3.5 Kriteria Sampel Penelitian

3.5.1 Inklusi

1. Usia diatas 18 tahun
2. Dalam kondisi sehat

3.5.2 Eksklusi

1. Memiliki riwayat penyakit darah
2. Memiliki Indeks Massa Tubuh (IMT) diatas nilai normal (Obesitas)

3.6 Prosedur Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan teknik eksperimen, menggunakan sel PBMC yang diambil dari darah vena seorang manusia sesuai persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara untuk menggunakan darah manusia sebagai subjek penelitian, dimana sampel yang merupakan total sel PBMC dari 5 mL darah dibagi ke dalam 2 kelompok perlakuan. Dalam penelitian ini digunakan desain eksperimen dengan tiga kali pengulangan ($n = 3$) untuk masing-masing

kelompok perlakuan, yaitu media RPMI dan DMEM. Pembagian ini mengacu pada panduan dari Sivandzade et al., yang menyarankan agar setiap sampel memiliki setidaknya tiga replikasi dan dilakukan pengamatan di lebih dari lima titik, guna memastikan keakuratan data dan mengurangi kemungkinan variasi antar sampel.⁷

Pada tahap pengamatan, pewarnaan JC-1 diamati dari lima titik lapangan pandang berbeda di tiap *well* yaitu dari bagian atas, bawah, kiri, kanan, dan tengah. Pengambilan lima titik dianggap sudah cukup representatif, karena mencerminkan distribusi fluoresensi dari berbagai sudut dalam satu *well*. Pemilihan lima titik ini juga mempertimbangkan keterbatasan alat dan waktu yang tersedia selama proses penelitian. Setiap titik diambil dari area yang berbeda dan tidak berdekatan, sehingga data yang dikumpulkan tetap bisa menggambarkan kondisi mitokondria secara menyeluruh dan tidak bias pada satu lokasi saja. Masing-masing kelompok terdiri dari 3 *well* plate yang terbuat dari bahan plastik berisi total sel PBMC yang dibagi sama rata. Semua sampel diberi suplementasi serum FBS dan ditempatkan pada inkubator untuk menjaga suhu tetap optimal.

3.6.1 Alat

- a. *Biological Safety Cabinet* (BSC 2) Tipe A II
- b. Inkubator CO₂ 5% 37°C
- c. Mikroskop *inverted*
- d. Kamar hitung Neubauer
- e. Mikroskop fluoresensi ZOE
- f. Sentrifuse MPW-260R
- g. Pendingin 4°C
- h. Waterbath 37°C
- i. Pipet boy
- j. Rak tabung 15 mL
- k. Mikropipet 1000 µL
- l. Mikropipet 10 µL

3.6.2 Bahan

- a. Darah vena manusia
- b. RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640
- c. DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- d. *Mitochondrial Membran Potential Detection Kit* (JC-1)
- e. FBS (*Fetal Bovine serum*)
- f. *Histopaque*077
- g. *Trypan Blue*
- h. Tabung falcon 15 mL
- i. Tabung 1,5 mL
- j. *24 well plate*
- k. Alkohol swab
- l. Pipet serologikal 10 mL
- m. Tip mikropipet 10-1000 μ L
- n. Pipet Pasteur
- o. Tourniquet
- p. Sduit 5cc
- q. Tabung darah vaculab EDTA K3 antikoagulan

3.6.3 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel sel PBMC pada penelitian ini menggunakan 4 mL darah vena manusia. Sel PBMC didapatkan dengan menamban cara memisahkan *buffy coat* dari sel darah merah dan juga plasma dengan reagen *Histopaque*. Berikut tahapan pengambilan sampel sel PBMC :

1. Pengambilan Darah.

Darah vena manusia diambil sebanyak 5 mL dengan bantuan petugas medis. Darah diambil dengan spuit 5cc dan dipindahkan ke tabung darah vaculab EDTA K3 antikoagulan. Pengambilan sampel darah dilakukan secepat mungkin dan simpan pada suhu ruangan, hindari suhu ekstrem dan penyimpanan jangka panjang

2. Isolasi PBMC

Darah vena yang diambil kemudian dimasukkan ke tabung 15 mL yang sudah diisi dengan reagen gradien densitas *Histopaque* sebelumnya, menggunakan perbandingan 1:1, lalu disentrifugasi untuk mendapatkan “*buffy coat*” atau PBMC selama 30 menit dengan kecepatan 1200 g dengan suhu ruangan tanpa menggunakan rem rotor, setelah selesai keluarkan tabung dengan perlahan, didapatkan 4 lapisan yang terdiri dari plasma, *buffy coat*, gradien densitas *Histopaque*, dan dipaling dasar tabung adalah sel darah meran dan granulosit. Langkah selanjutnya ambil semua *buff coat* dengan mikropipet 1000 μ L dan pindahkan ke tabung 15 mL baru untuk selanjutnya disentrifugasi ulang dengan menambahkan PBS menggunakan perbandingan volume 1:1 dari *buffy coat* yang didapatkan sebelumnya, homogenkan campuran keduanya dengan teknik memipet *up and down*, lalu sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 605 g, hasilnya berupa endapan didasar tabung yang disebut *pellet* PBMC. Setelah didapatkan *pellet* PBMC buang supernatan dan menyisakan 4 mL PBS resuspensi *pellet* dengan perlahan agar merata lalu hitung sel *trypan blue*, setelah didapatkan total sel PBMC pindahkan 2 mL campuran *pellet* dan PBS ke tabung baru, lalu beri label pada kedua tabung untuk menandai RPMI dan DMEM, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 300 g, selanjutnya buang supernatan dan sisakan hanya *pellet* PBMC saja didasar tabung dan tambahkan media RPMI dan DMEM yang sebelumnya sudah ditambah dengan 10% suplementasi serum FBS dan dihangatkan ke masing-masing tabung sebanyak 3 mL. Resuspensi *pellet* PBMC yang sudah ditambah media agar tercampur rata dengan media. Setelah didapatkan 2 media selanjutnya dilakukan penghitungan sel.³⁸

3.6.4 Perhitungan Sel

Tahap selanjutnya dilakukan perhitungan sel untuk mengetahui berapa jumlah *well* plate yang digunakan untuk dikultur di plate 24-*well*. sel dihitung dengan hemocytometer menggunakan mikroskop *inverted* yang

menggunakan *trypan blue* untuk membedakan antara sel hidup yang tidak berwarna dan sel mati dengan membran sel yang rusak akan berwarna biru. Pewarna *trypan blue* dapat dengan mudah menembus membran sel yang terkompromi dan mewarnai protein intraseluler, menghasilkan sel berwarna biru. Tahap ini penting untuk memastikan viabilitas dan jumlah sel dalam kultur sel. Sampel sel dicampur dengan larutan *trypan blue* dan dimasukkan di ruang antara hemocytometer dengan kisi khusus dan penutup kaca. Sel-sel dalam kotak dan konsentrasi sel awal suspensi dihitung (misalnya, untuk ruang dengan kedalaman 0,01 mm, jumlah sel yang diperkirakan dalam satu kotak besar dikalikan dengan 10.000 untuk mendapatkan jumlah sel per ml). Dalam perhitungan jumlah sel menggunakan hemocytometer, jumlah sel hidup per mililiter dapat dihitung dengan rumus,

$$\text{Jumlah sel hidup/mL} = \text{Jumlah sel hidup yang dihitung} \times 2 \times 10^4.$$

Rumus ini mengalikan jumlah sel hidup yang terhitung dengan faktor pengali 2 dan 10^4 untuk mendapatkan estimasi jumlah sel hidup dalam satu mililiter kultur.³⁰

3.6.5 Kultur PBMC

Persiapan kultur sel, khususnya untuk *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC), memerlukan perhatian khusus terhadap berbagai aspek, mulai dari peralatan yang digunakan hingga kondisi lingkungan yang optimal untuk pertumbuhan sel. Setelah sel dihitung kemudian di pindahkan kedalam wadah 24 *well* untuk dikultur selama 24 jam. Pada penelitian ini dilakukan 3 pengulangan sehingga setiap kelompok mendapatkan 3 *well*, dengan jumlah sel yang disesuaikan dengan batas normal dari setiap *well* yaitu 500-1 juta sel per *well* nya. setiap *well* berisi 500-1000 μL media dan 500.000-1.000.000 sel. Amati keadaan sel menggunakan mikroskop terbalik untuk memastikan sel dalam kondisi baik. Setelah itu, masukkan piring kultur ke dalam inkubator dengan CO₂ 5% pada suhu 37°C. Selanjutnya, amati sel setiap jam selama 4 jam, dan goyangkan piring 24-*well* ke depan dan belakang selama 5

menit setiap jam untuk memastikan distribusi sel yang merata. Setelah 4 jam, lakukan pergantian media dengan menggunakan dua mikropipet 1000 μL (satu di sisi kanan dan satu di sisi kiri) lakukan pergantian media dengan cepat untuk mencegah dehidrasi sel. Gunakan mikropipet kanan untuk mengambil media lama melalui dinding piring 24-*well*, sementara mikropipet kiri menambahkan 1 mL media baru secara perlahan ke dinding wadah sel. Setelah itu, masukkan kembali piring kultur ke dalam inkubator dan amati keesokan harinya selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan, pewarnaan JC-1.

3.6.6 JC-1 Staining

Setelah dikultur selama 24 jam selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan JC-1 dengan konsentrasi 0,4 $\mu\text{L}/\text{well}$. Sebelum diwarnai lihat sel yang ada di masing-masing *well* plate dibawah mikroskop *inverted* untuk melihat apakah monosit sudah menempel di dasar tabung dengan sempurna. Lalu diwarnai dengan JC-1 didalam BSC II. Siapkan JC-1 yang telah di aliquot sebelumnya, tabung 1,5 mL. Ambil 500 μL dari *well* yang ingin diwarnai, lalu pindahkan ke tabung 1,5 mL yang berisi 0,4 μL JC-1 resuspensi hingga tercampur rata selanjutnya masukkan kembali ke *well* yang diambil tadi begitu seterusnya. Setelah semua mendapat perlakuan yang sama, inkubasi selama 15 menit, proses ini penting untuk memungkinkan JC-1 masuk ke dalam sel dan berinteraksi dengan mitokondria, mengamati fluoresensi merah (agregat) yang menunjukkan potensi membran mitokondria yang mencerminkan status kesehatan sel. Gambar dilihat dengan 5 lapang pandang beda, dikumpulkan, dan dihitung. dan lihat dibawah mikroskop fluoresensi ZOE.

3.7 Teknik Pengumpulan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, yang mana data ini diperoleh dari hasil penelitian yang dilakukan secara langsung oleh peneliti.

3.7.1 Pengolahan Data

Berikut tahapan pengolahan data yang meliputi :

A. Pemeriksaan Data (*Editing*)

Data yang telah dikumpulkan dipastikan ketetapan dan kelengkapannya tersedia dan benar.

B. Pemberian Kode (*Coding*)

Data yang telah dikumpulkan dan diperiksa ketepatannya kemudian diberi kode secara manual. Pemberian kode ini mempermudah pengolahan data menggunakan program komputer seperti SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*)

C. Masukkan Data (*Entry*)

Data yang telah diberi kode dimasukkan ke dalam program komputer dengan transfer data dari format awal ke format yang dapat diproses oleh perangkat lunak.

D. Pembersihan Data (*Cleaning*)

Pemeriksaan ulang data yang telah dimasukkan ke dalam program komputer untuk menghindari kesalahan dalam input data. Pembersihan ini memastikan bahwa data yang dianalisis adalah data yang valid dan akurat.

E. Menyimpan Data (*Saving*)

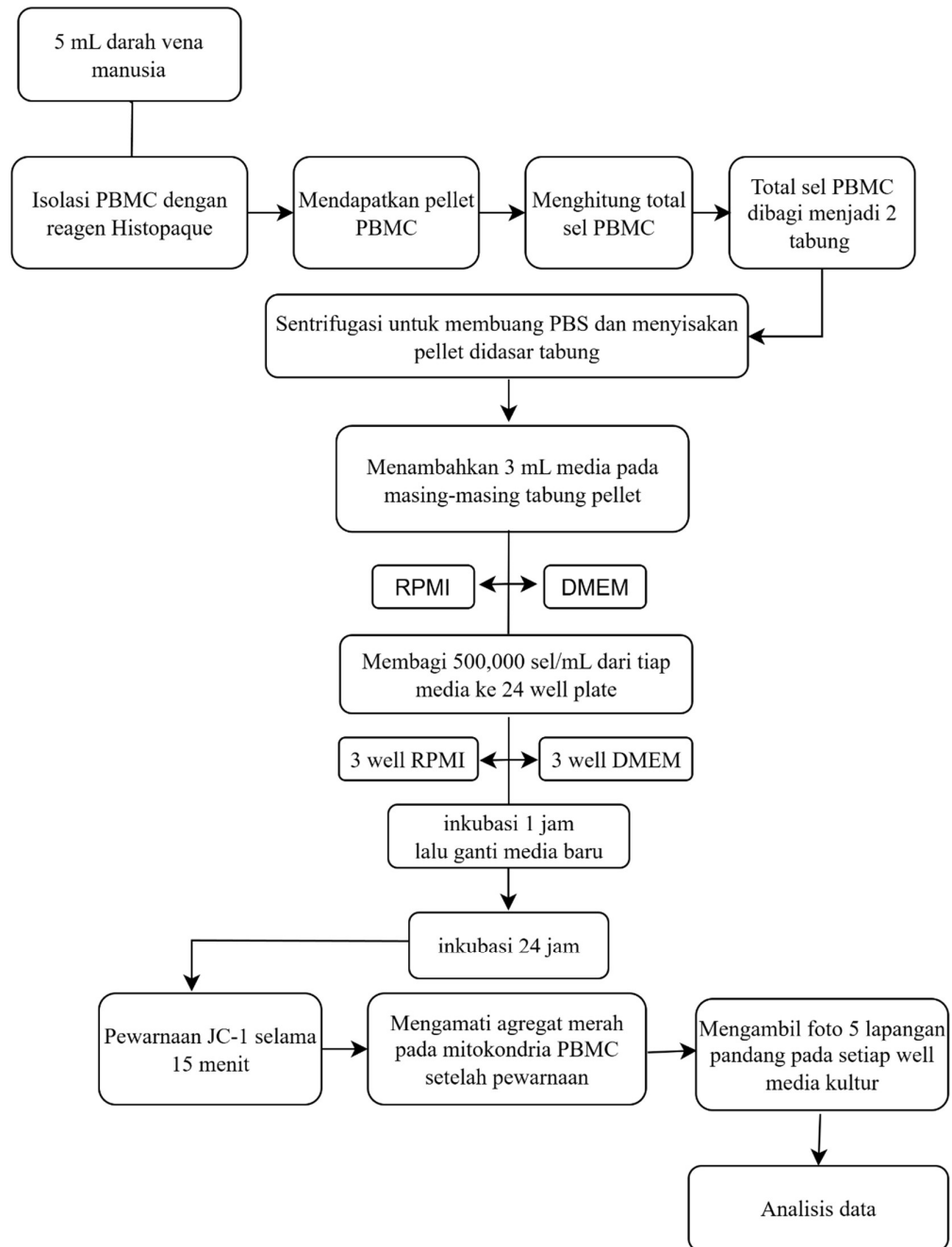
Menyimpan dan menyiapkan data sebaik-baiknya untuk memastikan bahwa data tidak hilang dan dapat diakses kembali saat analisis data.

3.7.2 Analisa Data

Data yang didapat dari setiap variabel pengamatan dicatat dan kemudian disusun ke dalam bentuk grafik. Dimulai dengan analisis univariat untuk menilai distribusi dan karakteristik variabel, seperti potensial membran mitokondria PBMC pada media RPMI dan DMEM yang telah diwarnai oleh JC-1, dengan menghitung statistik deskriptif seperti rata-rata, median, standar deviasi, dan frekuensi menggunakan *Shapiro-Wilk* apakah terdistribusi dengan normal atau tidak. Jika data

terdistribusi normal tahap berikutnya adalah analisis bivariat menggunakan uji *Independent T-Test*. Hasil analisis akan diinterpretasikan dengan menggunakan tingkat signifikansi p-value sebesar 0,05. Terdapat dua kemungkinan keputusan hipotesis yang didapat. Apabila nilai $p < 0,05$, hipotesis alternatif (H_1) diterima, menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok yang dibandingkan. Sebaliknya, jika nilai $p > 0,05$, hipotesis nol (H_0) diterima, menandakan tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok. Untuk menilai kekuatan statistik dari penelitian ini, dilakukan analisis *post hoc* menggunakan perangkat lunak *GPower*. Analisis ini bertujuan untuk menghitung nilai *power* statistik ($1 - \beta$) berdasarkan jumlah sampel, nilai efektivitas (*effect size*), dan tingkat signifikansi (α) yang digunakan. Jika nilai $power \geq 0,80$ menunjukkan bahwa penelitian memiliki kemungkinan sebesar 80% atau lebih untuk mendeteksi perbedaan nyata jika perbedaan tersebut memang benar-benar ada. Nilai *power* yang lebih rendah dari standar ini mengindikasikan bahwa kekuatan uji statistik masih terbatas, sehingga hasil yang tidak signifikan dapat disebabkan oleh kurangnya jumlah sampel atau variabilitas data yang tinggi.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3. 1. Alur Penelitian

BAB 4

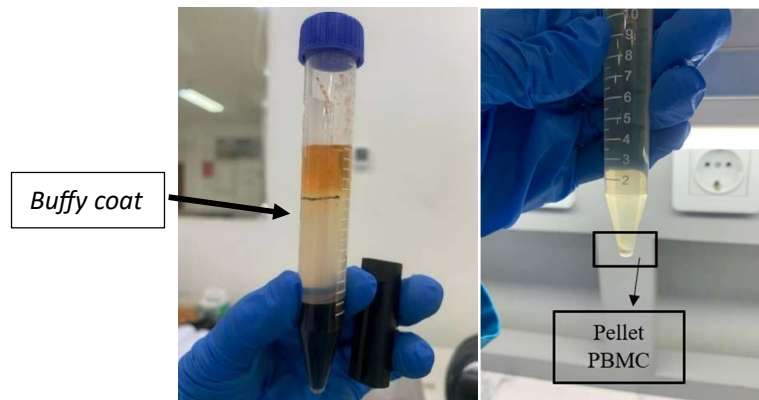
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara yang dimulai dari tanggal 18 Februari sampai dengan 21 Februari 2025. Penelitian ini dilakukan sesuai dengan prosedur dan aturan yang berlaku dan telah disetujui oleh Komite Etik Fakultas Kedokteran UMSU dengan No. 1193/KEPK/FKUMSU/2024.

4.1.1 Hasil Isolasi PBMC

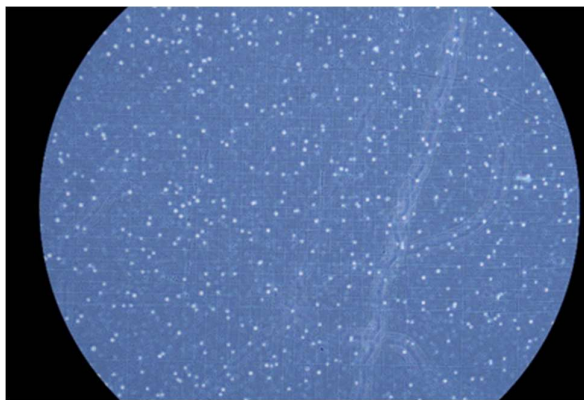
Isolasi PBMC dilakukan setelah pengambilan darah dari donor darah sehat yang memiliki Indeks Massa Tubuh sebesar $28,7 \text{ kg/m}^2$ sebanyak 5 mL darah yang dimasukkan kedalam tabung falcon. Prosedur isolasi dimulai dengan menambahkan reagen *Histopaque* dan 5 mL darah ke dalam tabung falcon 15 mL, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200 RCF (*Relative Centrifugal Force*) selama 30 menit. Setelah dilakukan sentrifugasi, darah terbagi menjadi empat lapisan, yaitu plasma darah dilapisan bagian atas, *buffy coat*, lapisan *Histopaque*, dan campuran granulosit serta sel darah merah dilapisan bagian bawah tabung. Lapisan *buffy coat* yang mengandung PBMC dipindahkan ke tabung baru. Hasil isolasi berupa *pellet* PBMC yang terdiri dari limfosit dan monosit. Monosit sebagai fokus utama isolasi PBMC ini, untuk menilai mitokondria.



Gambar 4. 1. Hasil isolasi PBMC

4.1.2 Hasil Perhitungan Sel PBMC

Perhitungan jumlah sel hidup pada sampel dilakukan dengan menggunakan pewarna *trypan blue* sebanyak 10 μL yang dicampur dengan suspensi sel sebanyak 10 μL dengan perbandingan 1:1. suspensi hasil pencampuran tersebut kemudian diamati menggunakan mikroskop *inverted* sebagai acuan untuk penanaman sel PBMC pada 24 *well* plate.



Gambar 4. 2. Hasil pewarnaan sel dengan *trypan blue*

Dari hasil pengamatan diperoleh jumlah sel hidup (berwarna terang) sebanyak 150 dari suspensi bervolume 4 mL PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Perhitungan jumlah sel hidup dilakukan dengan rumus berikut:

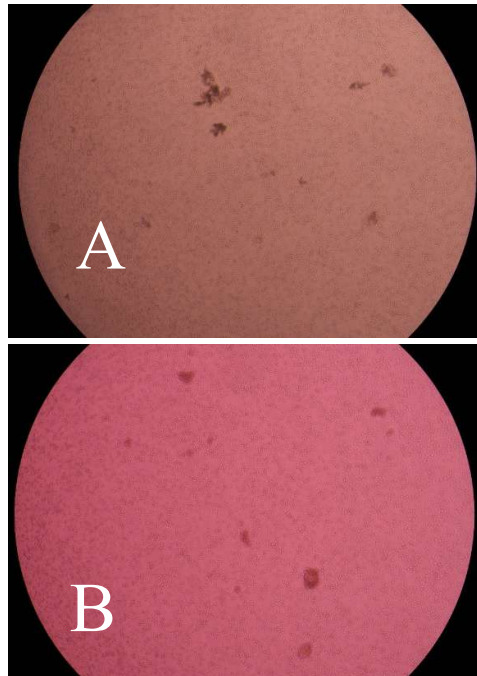
$$\text{Jumlah sel hidup/mL} = \text{Jumlah suspensi (mL)} \times 2 \times 10^4$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel hidup dalam kamar hitung} &= 150 \text{ sel} \\ &= 150 \times 2 \times 10^4 \\ &= 3.000.000 \text{ sel} \end{aligned}$$

Total sel hidup yang diperoleh adalah sebanyak 3 juta sel dalam 4 mL suspensi. Jumlah sel ini cukup untuk ditanam dalam 6 well pada 24 *well* plate, masing-masing kelompok mewakili 3 well dengan volume media per *well* sekitar 500 hingga 1000 μL dan jumlah sel yang dapat ditanam pada media tersebut sebanyak 50.000 hingga 1.000.000 sel per *well*. Dikatakan tidak cukup apabila sel yang didapatkan kurang dari 50.000 sel per *well* media.

4.1.3 Hasil Kultur PBMC

Pada kultur yang dilakukan selama 24 jam, diperoleh sel dalam kondisi sehat. Hasil kultur terlihat bahwa sel monosit melekat pada permukaan dinding 24 *well* plate yang menandakan bahwa sel berada dalam kondisi baik.



Gambar 4. 3. Hasil kultur PBMC dengan Media, A) RPMI dan B) DMEM

4.1.4 Hasil Pewarnaan Mitokondria dengan JC-1 pada Kultur PBMC

Hasil pewarnaan mitokondria menggunakan JC-1 menunjukkan adanya aktivitas mitokondria yang dapat diamati secara visual melalui mikroskop fluoresensi ZOE. Sel yang menyerap pewarna JC-1 akan membentuk agregat berfluoresensi merah di dalam mitokondria yang sehat (terpolarisasi). Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel berfluoresensi merah pada masing-masing *well*, dengan mengambil gambar dari lima titik lapangan pandang berbeda, yaitu bagian atas, bawah, kanan, kiri, dan tengah dari setiap *well*. Pendekatan lima titik ini dipilih untuk memastikan bahwa distribusi pengamatan mencakup seluruh area kultur sel dan tidak terfokus pada satu bagian saja. Jumlah

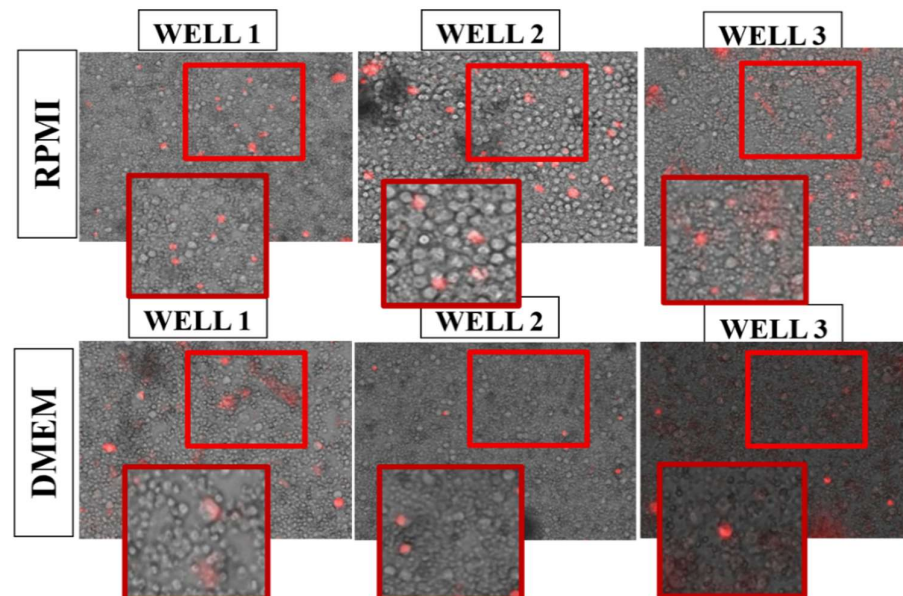
sel berfluoresensi merah yang diperoleh dari media RPMI dan DMEM adalah sebagai berikut:

Tabel 4. 1. Jumlah Sel Berfluoresensi Merah dari Media RPMI

<i>Well Plate</i>	Sel Menyerap Merah
1	48
2	52
3	60

Tabel 4. 2. Jumlah Sel Berfluoresensi Merah dari Media DMEM

<i>Well Plate</i>	Sel Menyerap Merah
1	43
2	42
3	47



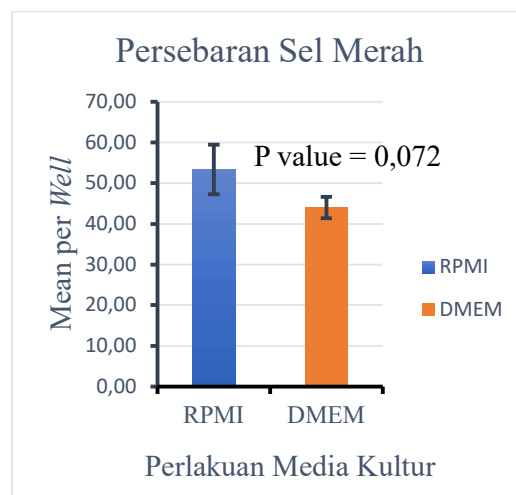
Gambar 4. 4. Hasil Pewarnaan dengan JC-1

Keterangan :

Kotak merah : Sel yang menyerap warna merah

4.1.5 Analisis Data Pewarnaan JC-1

Uji normalitas dilakukan menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk menilai distribusi data JC-1 pada setiap lapang pandang tiap kelompok. Diperoleh nilai p dari uji *Shapiro-Wilk* sebesar 0,637 untuk kelompok RPMI dan 0,363 untuk kelompok DMEM. Kedua kelompok memiliki nilai $\text{sig} > 0,05$, dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi secara normal. Selanjutnya, Uji *independent T test* dilakukan untuk membandingkan rata-rata jumlah sel JC-1 per lapang pandang antara well tiap kelompok media RPMI dan DMEM. Berdasarkan hasil Uji *independent T test* diperoleh nilai $p = 0,072$ ($p > 0,05$), yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok PBMC yang dikultur dalam media RPMI dan DMEM terhadap aktivitas mitokondria. Hasil perhitungan *power* statistik ($1 - \beta$) menggunakan perangkat lunak *GPower* menunjukkan bahwa nilai *power* dalam penelitian ini sebesar 0,45 atau 45% ($< 80\%$). Nilai *power* yang rendah ini menunjukkan bahwa kemampuan penelitian untuk mendeteksi perbedaan yang sebenarnya ada masih terbatas, sehingga terdapat kemungkinan bahwa hasil yang tidak signifikan disebabkan oleh keterbatasan jumlah sampel, bukan karena tidak adanya perbedaan secara nyata.



Gambar 4. 5. Grafik Rata-Rata Jumlah Sel PBMC Berfluoresensi Merah.

Berdasarkan grafik persebaran sel merah pada Gambar 4.5, terlihat bahwa rata-rata jumlah sel berfluoresensi merah per *well* pada kelompok RPMI sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DMEM. Namun demikian, analisis statistik menggunakan uji *Independent T-Test* menunjukkan bahwa perbedaan tersebut tidak signifikan secara statistik, hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara penggunaan media RPMI dan DMEM terhadap jumlah sel merah yang menunjukkan aktivitas mitokondria yang sehat.

4.2 Pembahasan

Dalam penelitian ini sel PBMC diisolasi dari darah vena manusia menggunakan metode sentrifugasi dengan larutan *Histopaque*. Setelah isolasi, jumlah sel hidup dihitung menggunakan pewarna *trypan blue*. Hasil perhitungan jumlah PBMC yang didapat dari isolasi darah vena manusia sekitar 3 juta sel hidup dari total volume 4 mL. Sel-sel tersebut kemudian dikultur selama 24 jam dalam media kultur RPMI dan DMEM dengan kondisi yang sama. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sel dari kedua jenis media tumbuh dengan baik, melekat pada permukaan dasar *well* plate, dan menunjukkan morfologi yang sehat. Untuk menilai aktivitas mitokondria, digunakan pewarna JC-1 yang menunjukkan perubahan potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$) dengan mengamati seberapa banyak sel yang aktif menyerap pewarna JC-1 sehingga membentuk agregat merah. Berdasarkan hasil pengamatan yang diperoleh menggunakan mikroskop ZOE *Fluorescent Cell Imager*, sel-sel yang dikultur dalam media RPMI menunjukkan intensitas fluoresensi merah yang lebih dominan dibandingkan dengan DMEM. Hal ini mengindikasikan bahwa JC-1 lebih banyak membentuk agregat merah pada mitokondria kelompok media RPMI.

Data penelitian dianalisis secara kuantitatif untuk meningkatkan keandalan hasil. Jumlah sel berfluoresensi merah dihitung dari lima lapangan pandang berbeda pada setiap *well*. Hasil analisis menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel berfluoresensi merah per *well* lebih tinggi pada kelompok RPMI

dibandingkan dengan DMEM. Namun, berdasarkan uji *Independent T-Test*, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok ($p = 0,072$, $\text{sig} > 0,05$). Selain itu, hasil perhitungan *power* statistik menggunakan perangkat lunak *G*Power* menunjukkan bahwa nilai *power* penelitian ini hanya sebesar 0,45 (45%), yang masih berada di bawah standar minimal 0,80 (80%). Nilai *power* yang rendah ini mengindikasikan bahwa kemampuan penelitian untuk mendeteksi perbedaan nyata masih terbatas, sehingga kemungkinan hasil yang tidak signifikan disebabkan oleh keterbatasan jumlah sampel.

Penelitian ini menggunakan dua jenis media kultur yang umum digunakan dalam pemeliharaan sel imun, yaitu RPMI 1640 dan DMEM, untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas mitokondria pada PBMC. Aktivitas mitokondria diamati menggunakan pewarna JC-1, yang bekerja dengan menunjukkan perubahan potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$). Pewarna ini menghasilkan fluoresensi merah pada mitokondria yang sehat (terpolarisasi).³⁹

Secara komposisi keduanya memiliki perbedaan kandungan nutrisi yang cukup signifikan. Perbedaan kandungan nutrisi ini termasuk konsentrasi glukosa, asam amino, vitamin, dan faktor pertumbuhan dapat memengaruhi metabolisme sel, fungsi mitokondria, dan fenotipe makrofag selama proses kultur baik melalui perubahan keseimbangan energi, regulasi stres oksidatif, maupun kemampuan sel dalam mempertahankan homeostasis mitokondria dalam jangka waktu tertentu.⁴⁰

Media RPMI 1640 mengandung glukosa 2 g/L lebih rendah dibandingkan DMEM, yang memiliki kadar glukosa 4,5 g/L yang lebih tinggi. Penelitian oleh Fu et al., menunjukkan bahwa paparan glukosa tinggi dapat memicu stres pada retikulum endoplasma akibat disfungsi *Mitochondria-Associated ER Membranes* (MAMs). Kondisi ini menyebabkan penumpukan kalsium di mitokondria (*Mitochondrial Calcium Overload*) dan peningkatan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*). Peningkatan ROS tersebut dapat menurunkan potensial membran mitokondria, yang pada akhirnya memicu apoptosis dan kerusakan sel glia.⁴¹ Hal ini sejalan dengan temuan Antonsen et al., yang menunjukkan bahwa komposisi media kultur terutama ketersediaan

asam amino non-esensial seperti asparagin, asam aspartat, asam glutamat, dan prolin berpengaruh besar pada morfologi sel, jumlah dan jenis protein di permukaan sel, pola ekspresi gen, dan pelepasan protein penting oleh makrofag hasil diferensiasi dari monosit manusia di kultur in vitro. Kekurangan asam amino seperti yang terjadi pada media DMEM dapat menyebabkan perubahan fenotipe makrofag yang tidak mencerminkan kondisi normal sehingga DMEM perlu penambahan asam amino seperti FBS (*Fetal Bovine Serum*) ke dalam media untuk memulihkan fenotipe dan fungsi makrofag mendekati keadaan normal.⁴²

Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun tidak terdapat perbedaan signifikan secara statistik, secara keseluruhan baik media RPMI maupun DMEM mampu mendukung pertumbuhan sel PBMC. Namun, apabila ditinjau dari segi efisiensi biaya, DMEM memiliki harga yang sedikit lebih murah dibandingkan RPMI. Oleh karena itu, DMEM dapat dipertimbangkan sebagai alternatif media kultur di laboratorium, khususnya apabila RPMI tidak tersedia, untuk keperluan analisis fungsi mitokondria PBMC dalam kultur jangka pendek.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Jumlah sampel yang digunakan tergolong sedikit, karena penelitian ini merupakan studi awal sehingga dimulai dengan jumlah sampel minimal untuk mengamati perbedaan awal antar kelompok perlakuan. Selain itu, penelitian ini tidak menerapkan metode *blind*, sehingga terdapat kemungkinan terjadinya bias pada hasil. Penelitian ini juga masih memerlukan dukungan dari referensi tambahan untuk memperkuat temuan yang diperoleh.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap pengaruh media kultur RPMI dan DMEM terhadap kualitas potensial membran mitokondria pada PBMC, dapat disimpulkan bahwa Penelitian ini menunjukkan bahwa media kultur RPMI dan DMEM memberikan hasil yang sebanding dalam mempertahankan potensial membran mitokondria PBMC berdasarkan pewarnaan JC-1. Tidak ditemukan perbedaan signifikan secara statistik, namun keterbatasan jumlah sampel dan rendahnya nilai power statistik mengindikasikan perlunya penelitian lanjutan dengan ukuran sampel lebih besar.

5.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya perlu dipertimbangkan peningkatan pada jumlah sampel dan donor berbeda untuk memperoleh kekuatan uji yang lebih optimal dan kuat secara statistik.
2. Meningkatkan jumlah titik pengamatan guna memperoleh hasil pengamatan lebih akurat dan konsisten.
3. Melakukan penelitian secara *blind* untuk meminimalkan hasil bias.
4. Menggunakan kontrol positif misalnya senyawa CCCP (Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazine) sebagai agen depolarisasi mitokondria dan kontrol negatif, untuk memperkuat validitas hasil pewarnaan JC-1 sehingga interpretasi data dapat dilakukan dengan lebih akurat dan terstandar.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mosallaei M, Ehtesham N, Rahimirad S, Saghi M, Vatandoost N, Khosravi S. PBMCs: a new source of diagnostic and prognostic biomarkers. *Arch Physiol Biochem. Taylor and Francis Ltd.* 2022;128(4):1081-1087. doi:10.1080/13813455.2020.1752257
2. Posevitz-Fejfar A, Posevitz V, Gross CC, et al. Effects of blood transportation on human peripheral mononuclear cell yield, phenotype and function: Implications for immune cell biobanking. *PLoS One.* 2014;9(12). doi:10.1371/journal.pone.0115920
3. Arora M. Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods.* 2023;3. doi:10.13070/mm.en.3.175
4. Syahidah HN, Hadisaputri YE. Review Artikel: Media Yang Digunakan Pada Kultur Sel. 2020;14(3).
5. Zhikhoreva AA, Belik VP, Belashov A V., et al. Spectral Characteristics of the DMEM Cell-Culture Medium. *Technical Physics.* 2018;63(9):1300-1303. doi:10.1134/S1063784218090256
6. Gong S, Fajar P, De Vries-Idema J, Huckriede A. Comparison of media for a human peripheral blood mononuclear cell-based in vitro vaccine evaluation system. *Clin Exp Vaccine Res.* 2023;12(4):328-336. doi:10.7774/cevr.2023.12.4.328
7. Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio Protoc.* 2019;9(1). doi:10.21769/BioProtoc.3128
8. Li X, Zhao Y, Yin J, Lin W. Organic fluorescent probes for detecting mitochondrial membrane potential. *Coord Chem Rev.* 2020;420:213419. doi:10.1016/J.CCR.2020.213419
9. Nadhira M, Puspitasari RL, Moegni KF, Rosadi I, Roslana I. *Profil Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Pasien Dengan Berbagai Usia Menggunakan Flow Cytometry Di Klinik Hayandra.* Vol 4.; 2018.
10. Weiss SL, Henrickson SE, Lindell RB, et al. Influence of Immune Cell Subtypes on Mitochondrial Measurements in Peripheral Blood Mononuclear Cells from

- Children with Sepsis. *Shock*. 2022;57(5):630-638. doi:10.1097/SHK.0000000000001903
11. Wesselink E, Koekkoek WAC, Grefte S, Witkamp RF, van Zanten ARH. Feeding mitochondria: Potential role of nutritional components to improve critical illness convalescence. *Clinical Nutrition.Churchill Livingstone*. 2019;38(3):982-995. doi:10.1016/j.clnu.2018.08.032
 12. Alfatni A, Riou M, Charles AL, et al. Peripheral blood mononuclear cells and platelets mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and circulating mtDNA. *J Clin Med.MDPI*. 2020;9(2). doi:10.3390/jcm9020311
 13. Sherwood L. *Introduction to Human Physiology*. 8th ed. EGC Penerbit Buku Kedokteran; 2014.
 14. Liu BH, Xu CZ, Liu Y, et al. Mitochondrial quality control in human health and disease. *Mil Med Res.BioMed Central Ltd*. 2024;11(1). doi:10.1186/s40779-024-00536-5
 15. Xie JH, Li YY, Jin J. The essential functions of mitochondrial dynamics in immune cells. *Cell Mol Immunol.Springer Nature*. 2020;17(7):712-721. doi:10.1038/s41423-020-0480-1
 16. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in health and disease. *Cells.MDPI*. 2019;8(7). doi:10.3390/cells8070680
 17. Li Y, Zhang H, Yu C, et al. New Insights into Mitochondria in Health and Diseases. *Int J Mol Sci.Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. 2024;25(18). doi:10.3390/ijms25189975
 18. Chen H, Schürch CM, Noble K, et al. Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. *BMC Immunol*. 2020;21(1). doi:10.1186/s12865-020-00345-0
 19. Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M, Malone KE. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. In: *Biopreservation and Biobanking*. Vol 14. Mary Ann Liebert Inc.; 2016:410-415. doi:10.1089/bio.2015.0104

20. Chometon TQ, Da Silva Siqueira M, Sant´anna JC, et al. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocytederived dendritic cells. *PLoS One*. 2020;15(4). doi:10.1371/journal.pone.0231132
21. Nedel W, Deutschendorf C, Portela LVC. Sepsis-induced mitochondrial dysfunction: A narrative review. *World J Crit Care Med*. 2023;12(3):139-152. doi:10.5492/wjccm.v12.i3.139
22. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne).Frontiers Media S.A.* 2021;12. doi:10.3389/fendo.2021.706978
23. Guerrier L, Malpuech-Brugère C, Richard R, Touron J. Mitochondrial Function in Healthy Human White Adipose Tissue: A Narrative Review. *Nutrients.Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. 2023;15(20). doi:10.3390/nu15204430
24. Fadlilah AR, Lestari K. *Peran Antioksidan Dalam Imunitas Tubuh*.
25. Vasam G, Reid K, Burelle Y, Menzies KJ. Nutritional Regulation of Mitochondrial Function. *Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes: Comprehensive Review on Mitochondrial Functioning and Involvement in Metabolic Diseases*. Published online January 1, 2019:93-126. doi:10.1016/B978-0-12-811752-1.00004-3
26. Yi PC, Zhuo L, Lin J, Chang C, Goddard A, Yoon OK. Impact of delayed PBMC processing on functional and genomic assays. *J Immunol Methods*. 2023;519. doi:10.1016/j.jim.2023.113514
27. Bager Christensen I, Ribas L, Mosshammer M, et al. Choice of medium affects PBMC quantification, cell size, and downstream respiratory analysis. *Mitochondrion*. 2024;77. doi:10.1016/j.mito.2024.101890
28. Arora M. Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*. 2023;3. doi:10.13070/mm.en.3.175
29. Gong S, Fajar P, De Vries-Idema J, Huckriede A. Comparison of media for a human peripheral blood mononuclear cell-based in vitro vaccine evaluation system. *Clin Exp Vaccine Res*. 2023;12(4):328-336. doi:10.7774/cevr.2023.12.4.328

30. Verenaacharwatt C, Editors A. *Cell Culture Technology*. Springer International Publishing AG, bagian dari Springer Nature; 2018. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-74854-2_2
31. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc.; 2017:151-172. doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
32. Sen P, Kemppainen E, Orešič M. Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Front Mol Biosci.Frontiers Media S.A.* 2018;4(JAN). doi:10.3389/fmolb.2017.00096
33. Elefantova K, Lakatos B, Kubickova J, Sulova Z, Breier A. Detection of the mitochondrial membrane potential by the cationic dye JC-1 in I1210 cells with massive overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7). doi:10.3390/ijms19071985
34. Carrageta DF, Freire-Brito L, Oliveira PF, Alves MG. Evaluation of Human Spermatozoa Mitochondrial Membrane Potential Using the JC-1 Dye. *Curr Protoc.* 2022;2(9). doi:10.1002/cpz1.531
35. Sunoqrot S, Abusulieh S, Sabbah D. Polymeric Nanoparticles Potentiate the Anticancer Activity of Novel PI3K α Inhibitors Against Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Biomedicines.* 2024;12(12). doi:10.3390/biomedicines12122676
36. Cayman Chemical. *JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay*. Accessed February 12, 2025. <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/10009172.pdf>
37. G-Biosciences. *JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay (Cat. # 786-1321, 786-1322)*. www.GBiosciences.com
38. Patrone D, Alessio N, Antonucci N, et al. Optimization of Peripheral Blood Mononuclear Cell Extraction from Small Volume of Blood Samples: Potential Implications for Children-Related Diseases. *Methods Protoc.* 2022;5(2). doi:10.3390/MPS5020020
39. Talluri TR, Bhardwaj A, Mehta SC, Pal Y. Efficacy of evaluation of mitochondrial membrane potential in equine spermatozoa using JC-1. *Indian Journal of Animal Sciences.* 2021;90(12):1599-1601. doi:10.56093/ijans.v90i12.113169

40. Moradi F, Moffatt C, Stuart JA. The effect of oxygen and micronutrient composition of cell growth media on cancer cell bioenergetics and mitochondrial networks. *Biomolecules*. 2021;11(8). doi:10.3390/biom11081177
41. Fu H, Xu J, Wang F, Wang W, Wang Z. High glucose-induced imbalance of mitochondria-associated ER membranes function promotes RSC96 cell damage. *Cell Mol Biol*. 2023;69(7):138-142. doi:10.14715/cmb/2023.69.7.22
42. Antonsen KW, Friis HN, Sorensen BS, Etzerodt A, Moestrup SK, Møller HJ. Comparison of culture media reveals that non-essential amino acids strongly affect the phenotype of human monocyte-derived macrophages. *Immunology*. 2023;170(3):344-358. doi:10.1111/imm.13670

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
Ketua
Assoc. Prof. Dr. Nurfadly, MKT

Lampiran 2. Surat Peminjaman Lab Terpadu

Lampiran : Satu Berkas

Medan, 15 Februari 2025

Kepada Yth.

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 : Luthfi Ariqoh

NPM : 2108260156

Status : Mahasiswa S1 FK UMSU

Judul : Analisis Perbandingan Kultur PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) Dengan Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) Dan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

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,

Luthfi Ariqoh

Lampiran 3. Surat Keterangan Selesai Penelitian



Laboratorium Terpadu

SURAT KETERANGAN SELESAI PENELITIAN

Nomor : 27/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 : Luthfi Ariqoh
NPM : 2108260156
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 Perbandingan Kultur PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear*) Dengan Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) Dan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)"

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

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

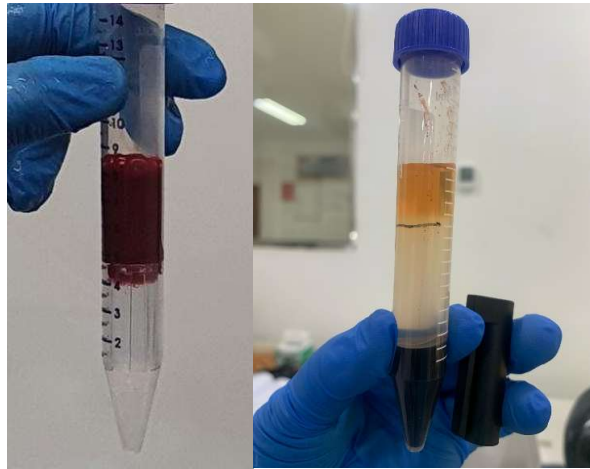
Kepala Laboratorium Terpadu

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

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

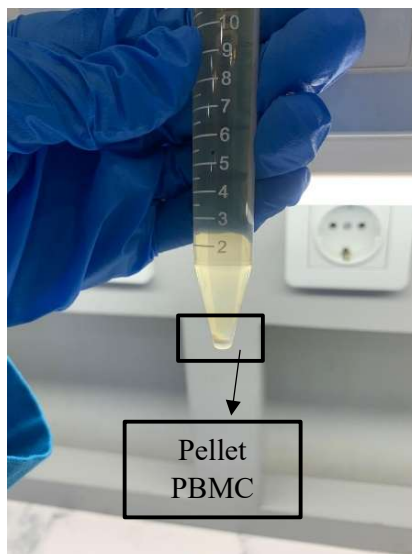


Lampiran 4. Hasil Isolasi PBMC



(A)

(B)



(C)

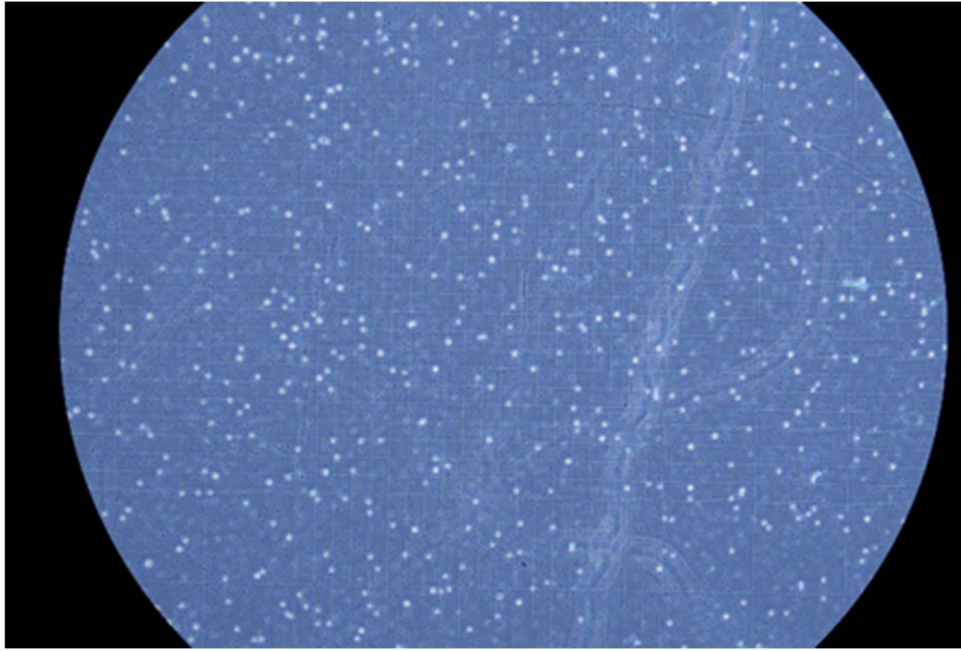
Keterangan :

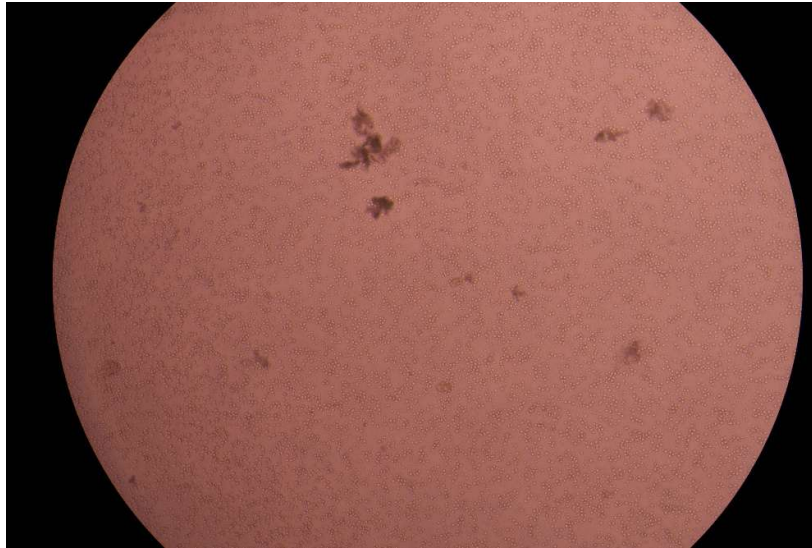
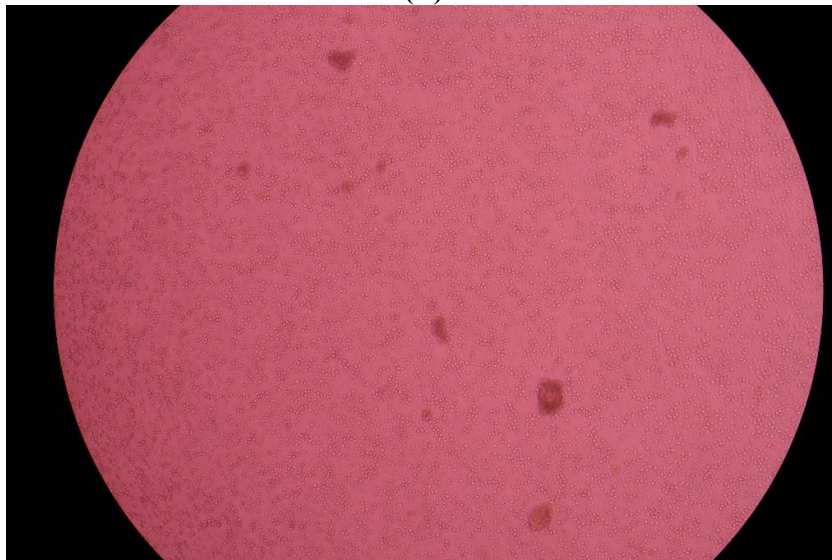
Gambar A : Sampel darah sebelum di sentrifugasi

Gambar B : Sampel darah sesudah di sentrifugasi

Gambar C : *Pellet* PBMC

Lampiran 5. Analisis Data Perhitungan Sel dengan *Trypan Blue*



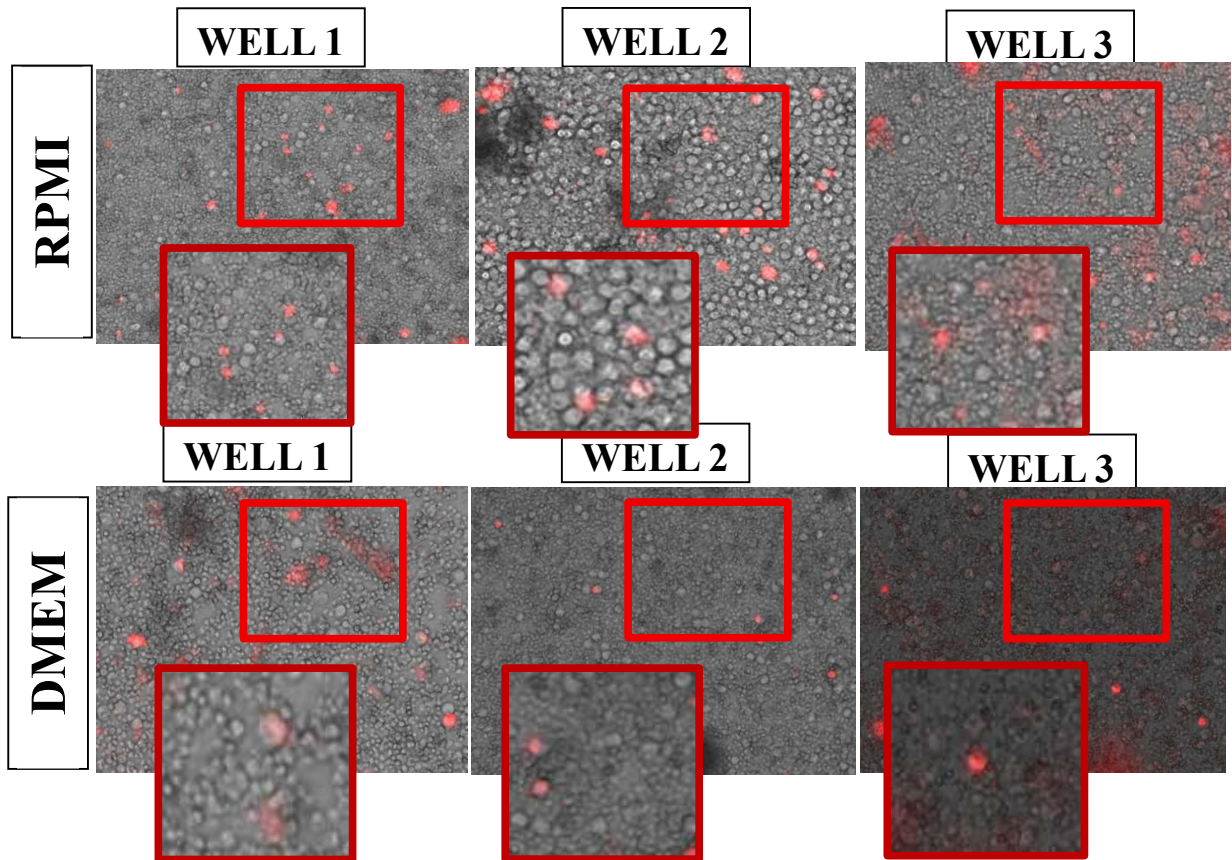
Lampiran 6. Hasil Kultur PBMC**(A)****(B)**

Keterangan :

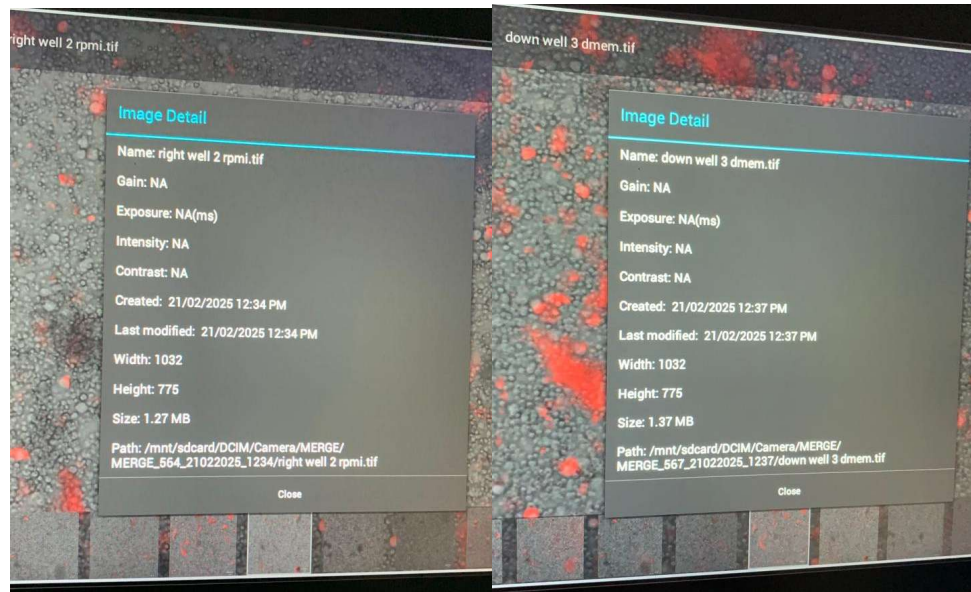
Gambar A : Sel dikultur dengan media RPMI

Gambar B : Sel dikultur dengan media DMEM

Lampiran 7. Hasil Pewarnaan JC-1 pada Kultur PBMC



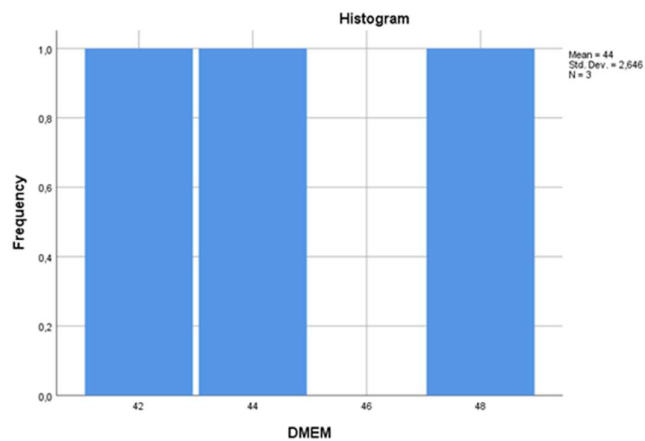
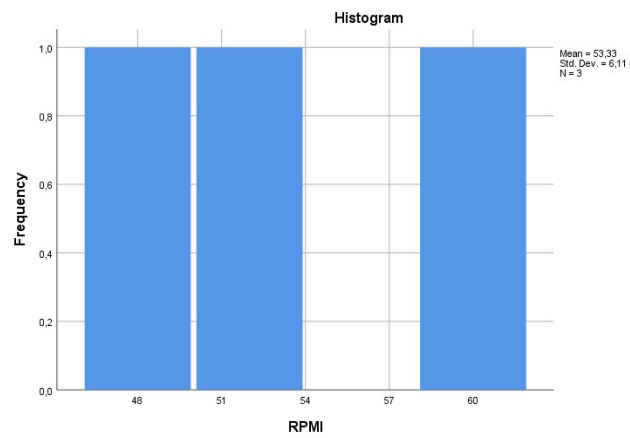
Lampiran 8. *Timestamp* Pemeriksaan JC-1 di Mikroskop Fluoresensi



Lampiran 9. Analisis Data Pewarnaan JC-1 (Hasil SPSS)
Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
RPMI	,253	3	.	,964	3	,637
DMEM	,314	3	.	,893	3	,363

a. Lilliefors Significance Correction



Uji Independent T Test

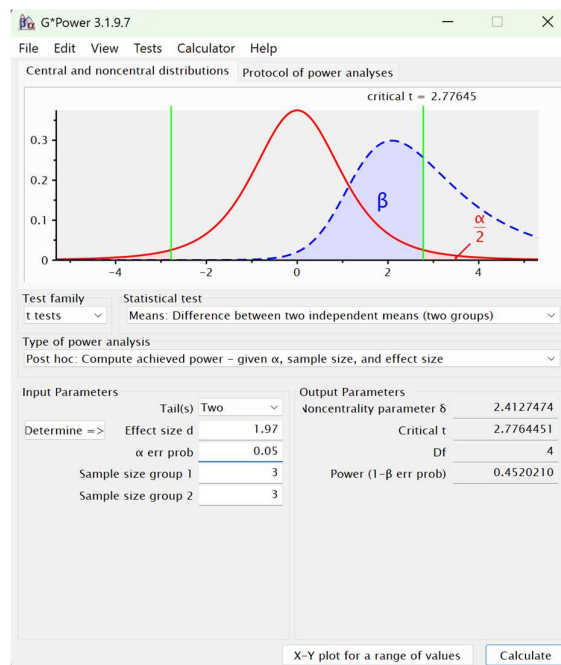
Group Statistics

	media RPMI, DMEM	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
nilai total RPMI, DMEM per well	RPMI	3	53,33	6,110	3,528
	DMEM	3	44,00	2,646	1,528

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
nilai total RPMI, DMEM per well	Equal variances assumed	2,060	,225	2,428	4	,072	9,333	3,844	-1,340	20,007
	Equal variances not assumed			2,428	2,725	,102	9,333	3,844	-3,631	22,298

Uji Pos Hoc GPower

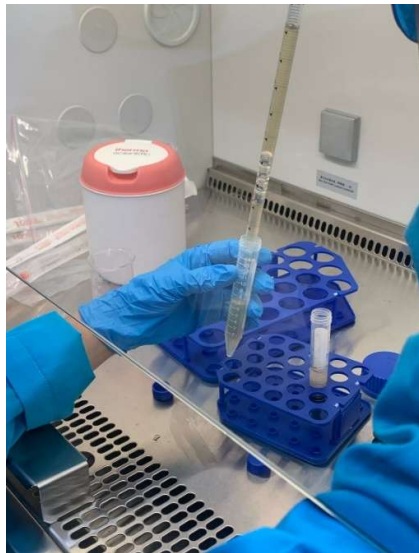


Lampiran 10. Dokumentasi Kegiatan

Hasil Sentrifugasi



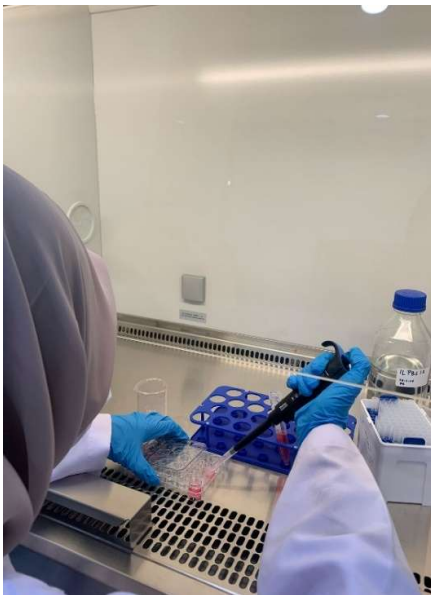
Pemindahan Buffycoat ke tabung baru



Perhitungan sel hidup di mikroskop *inverted*



Penanaman media ke 24 well plate



Pengecekan media setelah 1 jam inkubasi



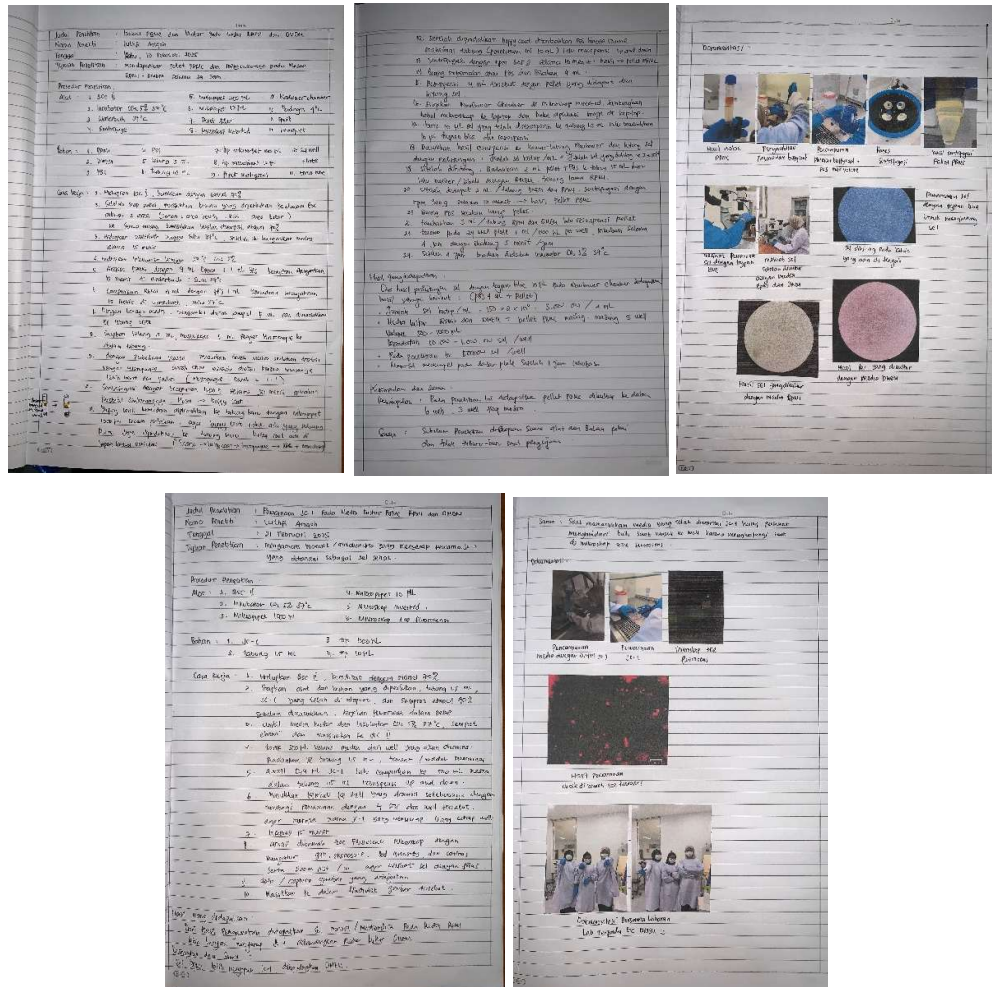
Proses pewarnaan JC-1 pada media



Pengecekan dibawah mikroskop fluoresensi ZOE



Logbook Penelitian di Laboratorium FK UMSU



Lampiran 11. Artikel Publikasi

PERBANDINGAN PEWARNAAN JC-1 PADA PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) YANG DIKULTUR DENGAN MEDIA RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) DAN DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Luthfi Ariqoh¹, Zukhrofi Muzar², Yulia Fauziyah³, Isra Thristy^{4*}

Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

Penulis Korespondensi: Zukhrofi Muzar

Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

lutfiqoo@gmail.com¹, zukhrofimuzar@umsu.ac.id²

ABSTRAK

Latar belakang: *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) merupakan sel imun yang umum digunakan dalam penelitian imunologi, toksikologi, dan onkologi. Aktivitas mitokondria sebagai indikator kesehatan sel dapat dinilai melalui pewarnaan JC-1. Penelitian ini bertujuan membandingkan efektivitas media RPMI 1640 dan DMEM terhadap potensial membran mitokondria PBMC. **Metode:** Penelitian eksperimental ini menggunakan desain *post test only control group* dengan sampel PBMC dari 5 mL darah vena manusia yang dikultur selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pewarnaan JC-1 dan diamati dengan mikroskop fluoresensi ZOE. **Hasil:** penelitian menunjukkan fluoresensi merah lebih dominan pada RPMI. Dari hasil uji *independent t-test* menunjukkan bahwa nilai sig.(p-value) = 0,072. **Kesimpulan:** tidak terdapat perbedaan signifikan antara media RPMI dan DMEM dengan potensial membran mitokondria yang dinilai melalui pewarnaan JC-1. **Kata Kunci :** DMEM, JC-1, PBMC, potensial membran mitokondria, RPMI

ABSTRACT

Background: *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) are immune cells commonly used in immunology, toxicology, and oncology research. Mitochondrial activity, as an indicator of cell health, can be assessed through JC-1 staining. This study aims to compare the effectiveness of RPMI 1640 and DMEM media on the mitochondrial membrane potential of PBMCs. **Methods:** This experimental study used a *post-test only control group* design with PBMC samples from 5 mL of human venous blood cultured for 24 hours. JC-1 staining was then performed and observed using a ZOE fluorescence microscope. **Results:** The study showed that red fluorescence was more dominant in RPMI. The results of the independent *t-test* showed a significance level (p-value) of 0.072. **Conclusion:** There was no significant difference between RPMI and DMEM media in terms of mitochondrial membrane potential as assessed by JC-1 staining.

Keywords: DMEM, JC-1, PBMC, mitochondrial membrane potential, RPMI

PENDAHULUAN

Penelitian di bidang biomedis, khususnya dalam cabang imunologi, toksikologi, dan onkologi, sering menggunakan sel darah manusia yang dikultur di luar tubuh (*in vitro*). Salah satu jenis sel darah yang sering digunakan adalah *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC), yaitu kumpulan sel imun yang terdiri dari limfosit dan monosit.¹

Kultur PBMC memiliki peran penting dalam berbagai penelitian yang bertujuan untuk mengetahui respons imun, uji toksisitas obat, dan mekanisme dari beberapa jenis penyakit seperti infeksi, alergi, dan penyakit autoimun. Agar PBMC tetap hidup dan mampu menjalankan fungsinya selama dikultur, pemilihan media kultur yang tepat menjadi hal yang sangat penting dalam perancangan suatu eksperimen.²

Media kultur berfungsi sebagai lingkungan buatan yang menyediakan nutrisi, buffer pH, dan kondisi ionik yang mendukung metabolisme dan viabilitas sel. Dua jenis media yang paling umum digunakan dalam kultur sel PBMC adalah RPMI 1640 dan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Kedua media ini dikenal luas karena ketersediaannya, harga yang relatif ekonomis, serta kandungan nutrisinya yang dapat disesuaikan dengan kebutuhan berbagai jenis sel. Namun demikian, belum banyak penelitian yang secara langsung membandingkan efektivitas kedua media ini terhadap aktivitas mitokondria PBMC, terutama dilihat dari parameter penting seperti potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$).³

RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) biasa digunakan untuk sel-sel darah seperti limfosit, media ini punya pH sekitar 8 yang sedikit lebih tinggi dari media kultur lainnya serta menggunakan sistem penyangga bikarbonat untuk

menjaga kestabilan pH. RPMI cocok digunakan untuk sel yang tumbuh melayang (suspensi) maupun menempel (monolayer). Dalam hal ini, limfosit merupakan jenis sel yang berada dalam suspensi dan tidak menempel pada permukaan wadah kultur, sedangkan monosit menunjukkan kecenderungan alami untuk menempel pada dasar permukaan kultur. Media ini sudah sering dipakai dalam berbagai penelitian, seperti kultur limfosit yang baru diambil dari darah, menyatukan dua sel berbeda dalam teknik fusi sel, memproduksi antibodi melalui kultur sel hybridoma serta studi imunologi lain karena kemampuannya dalam mempertahankan viabilitas PBMC.⁴

Berbeda dengan RPMI, DMEM awalnya diformulasikan untuk kultur sel embrio tikus, namun kini banyak digunakan untuk berbagai jenis sel mamalia. Kandungan glukosa tinggi dalam DMEM (4.500 mg/L) terbukti optimal untuk menunjang pertumbuhan banyak jenis sel. Meskipun tidak secara khusus dirancang untuk sel imun, DMEM tetap dapat digunakan untuk PBMC dengan penyesuaian tertentu terutama dalam konteks sel yang menempel (sel adheren) seperti sel HeLa, fibroblast, dan dalam penelitian ini monosit.⁵

Penelitian oleh Shuran Gong dkk. membandingkan berbagai media kultur dalam mendukung respons imun PBMC. Hasilnya menunjukkan bahwa RPMI memiliki kecenderungan memberikan viabilitas sel yang lebih tinggi dibandingkan DMEM dalam kondisi tertentu. Meskipun DMEM bukan media khusus untuk PBMC, studi tersebut menilai bahwa DMEM tetap memiliki potensi apabila digunakan sebagai media kultur jangka pendek kurang dari tiga hari

seperti dalam penelitian ini yang melakukan perbandingan efektivitas antara media RPMI dengan DMEM melalui pewarnaan JC-1 selama 24 jam untuk memantau aktivitas mitokondria. Oleh karena itu, penting untuk menilai performa antara media RPMI dan DMEM dalam kultur PBMC karena masing-masing punya kelebihan tergantung pada tujuan kultur.⁶

Kualitas dan fungsi PBMC tidak hanya dipengaruhi oleh media kultur, tetapi juga oleh berbagai faktor lain seperti usia donor, kondisi kesehatan, metode isolasi, faktor lingkungan tempat kultur dilakukan, serta kondisi mitokondria yang dikenal sebagai "pembangkit tenaga" sel. Mitokondria tidak hanya berperan dalam memproduksi energi (ATP), tetapi juga berperan penting dalam mengatur sinyal imun. Kesehatan mitokondria penting dalam mendukung aktivitas fisiologis dan imunologis PBMC yang dapat dilihat menggunakan indikator potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$) melalui pewarnaan JC-1 sebagai pewarna kationik yang membedakan kondisi mitokondria berdasarkan polaritas membran.⁷

Pada mitokondria yang sehat JC-1 membentuk agregat merah, dalam konteks menjaga fungsi mitokondria perbandingan media kultur RPMI dan DMEM yang memiliki perbedaan komposisi terhadap pewarnaan JC-1 pada PBMC dapat memberikan gambaran yang lebih spesifik mengenai bagaimana media tersebut memengaruhi $\Delta\Psi_m$ dan kesehatan fungsi mitokondria sel PBMC.⁸

Melalui penelitian ini, diharapkan bisa diketahui media mana yang lebih baik dalam menjaga kesehatan mitokondria PBMC, dengan pewarnaan JC-1 sebagai indikator visual $\Delta\Psi_m$. Hasil dari penelitian ini diharapkan bisa membantu dalam merancang eksperimen yang lebih efektif dan juga memberi gambaran awal

untuk penggunaan media kultur sel dalam terapi sel imun atau aplikasi medis lainnya di masa mendatang.

METODE

Penelitian ini merupakan eksperimental analitik dengan desain *post-test only control group*. Sampel berupa sel PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) diperoleh dari lima mL darah vena seorang donor sehat sesuai kriteria inklusi dan eksklusi, dengan izin dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Isolasi PBMC dilakukan menggunakan metode gradien densitas dengan Histopaque, kemudian dicuci dengan PBS, dihitung viabilitasnya dengan hemocytometer menggunakan *trypan blue*, dan dibagi ke dalam dua kelompok perlakuan yaitu media kultur RPMI dan DMEM yang telah ditambah 10% FBS. Sel dikultur dalam 24-well plate sebanyak 500.000–1.000.000 sel per well, diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂ selama 24 jam, dan setiap kelompok dibuat tiga kali ulangan ($n=$ tiga). Setelah inkubasi, dilakukan pewarnaan dengan JC-1 (0,4 μ L/well) selama 15 menit, lalu diamati fluoresensinya menggunakan mikroskop fluoresensi pada lima lapang pandang berbeda (atas, bawah, kiri, kanan, dan tengah).

Data hasil pengamatan dicatat dan dianalisis secara univariat (rata-rata, standar deviasi, uji normalitas *Shapiro-Wilk*), kemudian dilanjutkan dengan uji *Independent T-Test* pada tingkat signifikansi $p<0,05$. Untuk menilai kekuatan uji, dilakukan analisis *post hoc* dengan perangkat lunak GPower, dimana nilai power $\geq 0,80$ dianggap menunjukkan kekuatan statistik yang memadai

HASIL

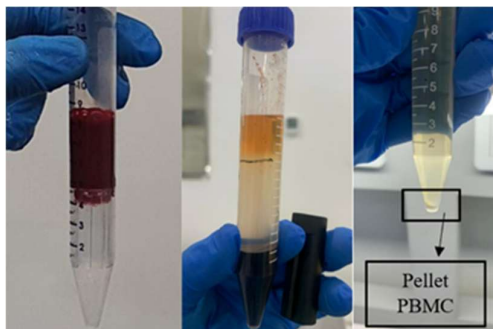
Dari penelitian ini, didapatkan karakteristik sampel berupa seorang donor sehat dengan IMT 28,7 kg/m² yang diambil darahnya sebanyak lima mL. Seleksi sampel dilakukan berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

Tabel 1. Kriteria Sampel

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

Hasil Isolasi PBMC

Darah dimasukkan ke dalam tabung falcon berisi reagen Histopaque, kemudian disentrifugasi pada 1200 RCF selama 30 menit hingga terbentuk empat lapisan, yaitu plasma, *buffy coat*, lapisan histopaque, serta campuran granulosit dan eritrosit. Lapisan *buffy coat* yang mengandung PBMC kemudian dipindahkan ke tabung baru dan menghasilkan pellet sel yang terdiri dari limfosit dan monosit. Monosit menjadi fokus utama isolasi PBMC untuk penilaian mitokondria.



Gambar 1. Hasil Isolasi PBMC

Hasil Perhitungan Sel PBMC

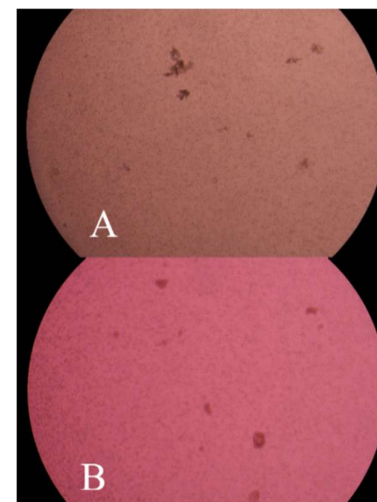
Viabilitas sel dihitung dengan metode pewarnaan *trypan blue* menggunakan mikroskop *inverted*. Dari hasil perhitungan diperoleh sekitar tiga juta sel hidup dalam empat mL suspensi PBS. Jumlah ini cukup untuk ditanam ke dalam 6 *well* pada 24-*well plate*, masing-masing *well* berisi 50.000 hingga 1.000.000 sel dengan volume media 500–1000 µL.



Gambar 2. Hasil Pewarnaan *Trypan Blue*

Hasil Kultur PBMC

Pada kultur yang dilakukan selama 24 jam, diperoleh sel dalam kondisi sehat. Hasil kultur terlihat bahwa sel monosit melekat pada permukaan dinding 24 *well plate* yang menandakan bahwa sel berada dalam kondisi baik.



Gambar 3. Hasil Kultur PBMC
A) RPMI, B) DMEM

Hasil Pewarnaan JC-1 Pada Kultur PBMC dengan Media RPMI dan DMEM

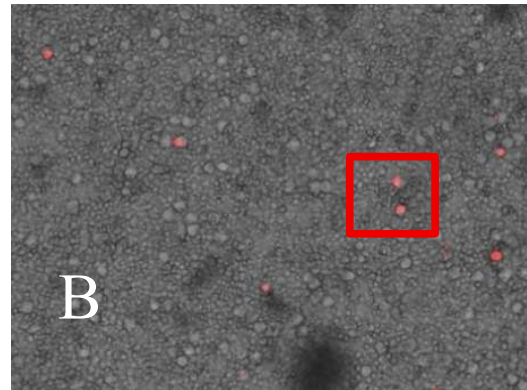
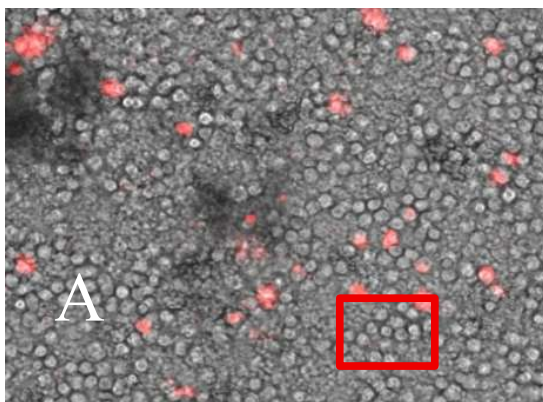
Hasil pewarnaan menggunakan JC-1 menunjukkan bahwa sel membentuk agregat fluoresensi merah yang menggambarkan aktivitas mitokondria sehat dan dapat diamati melalui mikroskop fluoresensi. Jumlah sel berfluoresensi merah yang diperoleh dari media RPMI dan DMEM adalah sebagai berikut :

Tabel 2. Jumlah Sel Berfluoresensi Merah pada Media RPMI

<i>Well Plate</i>	Sel Menyerap Merah
1	48
2	52
3	60

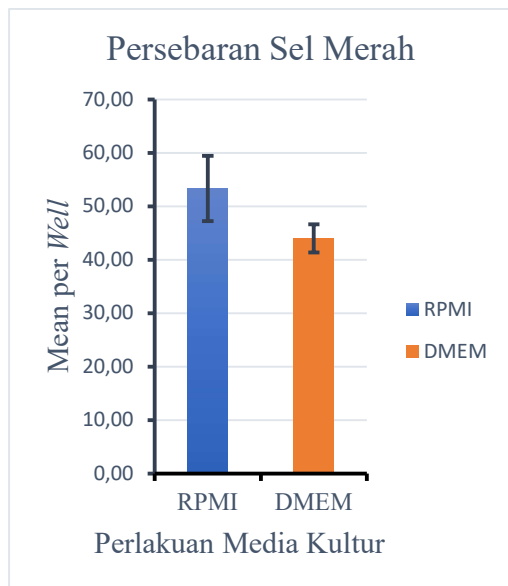
Tabel 3. Jumlah Sel Berfluoresensi Merah pada Media DMEM

<i>Well Plate</i>	Sel Menyerap Merah
1	43
2	42
3	47



Gambar 4. Hasil Pewarnaan JC-1 Media
A) RPMI, B) DMEM

Uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal baik pada kelompok RPMI ($p=0,637$) maupun DMEM ($p=0,363$). Selanjutnya, uji *independent T test* dilakukan untuk membandingkan rata-rata jumlah sel berfluoresensi merah per lapangan pandang antara kelompok RPMI dan DMEM. Hasil analisis menunjukkan terdapat tren peningkatan jumlah sel merah pada kelompok RPMI dibandingkan dengan DMEM, namun perbedaan ini tidak signifikan secara statistik $p=0,072$. Perhitungan power statistik *post hoc* dengan *GPower* menunjukkan nilai power sebesar 45%, yang mengindikasikan daya penelitian rendah sehingga kemungkinan perbedaan nyata tidak terdeteksi akibat keterbatasan jumlah sampel. Dengan demikian, meskipun terdapat kecenderungan jumlah sel berfluoresensi merah lebih tinggi pada kultur PBMC dengan media RPMI, perbedaan tersebut tidak bermakna secara statistik.



Gambar 5. Grafik Mean Jumlah PBMC Berfluoresensi Merah

PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini sel PBMC diisolasi dari darah vena manusia menggunakan metode sentrifugasi dengan larutan Histopaque. Setelah isolasi, jumlah sel hidup dihitung menggunakan pewarna trypan blue. Hasil perhitungan jumlah PBMC yang didapat dari isolasi darah vena manusia sekitar tiga juta sel hidup dari total volume empat mL. Sel-sel tersebut kemudian dikultur selama 24 jam dalam media kultur RPMI dan DMEM dengan kondisi yang sama. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sel dari kedua jenis media tumbuh dengan baik, melekat pada permukaan dasar well plate, dan menunjukkan morfologi yang sehat.

Untuk menilai aktivitas mitokondria, digunakan pewarna JC-1 yang menunjukkan perubahan potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$) dengan mengamati seberapa banyak sel yang aktif menyerap pewarna JC-1 sehingga membentuk agregat merah. Berdasarkan hasil pengamatan yang diperoleh menggunakan mikroskop ZOE

Fluorescent Cell Imager, sel-sel yang dikultur dalam media RPMI menunjukkan intensitas fluoresensi merah yang lebih dominan dibandingkan dengan DMEM. Hal ini mengindikasikan bahwa JC-1 lebih banyak membentuk agregat merah pada mitokondria kelompok media RPMI.

Data penelitian dianalisis secara kuantitatif untuk meningkatkan keandalan hasil. Jumlah sel berfluoresensi merah dihitung dari lima lapangan pandang berbeda pada setiap well. Hasil analisis menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel berfluoresensi merah per well lebih tinggi pada kelompok RPMI dibandingkan dengan DMEM. Namun, berdasarkan uji *independent t-test*, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok ($p = 0,072$, $\text{sig} > 0,05$). Selain itu, hasil perhitungan power statistik menggunakan perangkat lunak *G*Power* menunjukkan bahwa nilai power penelitian ini hanya sebesar 0,45 (45%), yang masih berada di bawah standar minimal 0,80 (80%). Nilai power yang rendah ini mengindikasikan bahwa kemampuan penelitian untuk mendeteksi perbedaan nyata masih terbatas, sehingga kemungkinan hasil yang tidak signifikan disebabkan oleh keterbatasan jumlah sampel.

Penelitian ini menggunakan dua jenis media kultur yang umum digunakan dalam pemeliharaan sel imun, yaitu RPMI 1640 dan DMEM, untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas mitokondria pada PBMC. Aktivitas mitokondria diamati menggunakan pewarna JC-1, yang bekerja dengan menunjukkan perubahan potensial membran mitokondria ($\Delta\Psi_m$). Pewarna ini menghasilkan fluoresensi merah pada mitokondria yang sehat (terpolarisasi).⁹

Secara komposisi keduanya memiliki perbedaan kandungan nutrisi yang cukup signifikan. Perbedaan kandungan nutrisi

ini termasuk konsentrasi glukosa, asam amino, vitamin, dan faktor pertumbuhan dapat memengaruhi metabolisme sel, fungsi mitokondria, dan fenotipe makrofag selama proses kultur baik melalui perubahan keseimbangan energi, regulasi stres oksidatif, maupun kemampuan sel dalam mempertahankan homeostasis mitokondria dalam jangka waktu tertentu.¹⁰

Media RPMI 1640 mengandung glukosa 2 g/L lebih rendah dibandingkan DMEM, yang memiliki kadar glukosa 4,5 g/L yang lebih tinggi. Penelitian oleh Fu et al., menunjukkan bahwa paparan glukosa tinggi dapat memicu stres pada retikulum endoplasma akibat disfungsi *Mitochondria-Associated ER Membranes* (MAMs). Kondisi ini menyebabkan penumpukan kalsium di mitokondria (*Mitochondrial Calcium Overload*) dan peningkatan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*). Peningkatan ROS tersebut dapat menurunkan potensial membran mitokondria, yang pada akhirnya memicu apoptosis dan kerusakan sel glia.¹¹

Hal ini sejalan dengan temuan Antonsen et al., yang menunjukkan bahwa komposisi media kultur terutama ketersediaan asam amino non-esensial seperti asparagin, asam aspartat, asam glutamat, dan prolin berpengaruh besar pada morfologi sel, jumlah dan jenis protein di permukaan sel, pola ekspresi gen, dan pelepasan protein penting oleh makrofag hasil diferensiasi dari monosit manusia di kultur in vitro. Kekurangan asam amino seperti yang terjadi pada media DMEM dapat menyebabkan perubahan fenotipe makrofag yang tidak mencerminkan kondisi normal sehingga DMEM perlu penambahan asam amino seperti FBS (*Fetal Bovine Serum*) ke dalam media untuk memulihkan fenotipe

dan fungsi makrofag mendekati keadaan normal.¹¹

Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun tidak terdapat perbedaan signifikan secara statistik, secara keseluruhan baik media RPMI maupun DMEM mampu mendukung pertumbuhan sel PBMC. Namun, apabila ditinjau dari segi efisiensi biaya, DMEM memiliki harga yang sedikit lebih murah dibandingkan RPMI. Oleh karena itu, DMEM dapat dipertimbangkan sebagai alternatif media kultur di laboratorium, khususnya apabila RPMI tidak tersedia, untuk keperluan analisis fungsi mitokondria PBMC dalam kultur jangka pendek.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Jumlah sampel yang digunakan tergolong sedikit, karena penelitian ini merupakan studi awal sehingga dimulai dengan jumlah sampel minimal untuk mengamati perbedaan awal antar kelompok perlakuan. Selain itu, penelitian ini tidak menerapkan metode blind, sehingga terdapat kemungkinan terjadinya bias pada hasil. Penelitian ini juga masih memerlukan dukungan dari referensi tambahan untuk memperkuat temuan yang diperoleh.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap pengaruh media kultur RPMI dan DMEM terhadap kualitas potensial membran mitokondria pada PBMC, dapat disimpulkan bahwa Penelitian ini menunjukkan bahwa media kultur RPMI dan DMEM memberikan hasil yang sebanding dalam mempertahankan potensial membran mitokondria PBMC berdasarkan pewarnaan JC-1. Tidak ditemukan perbedaan signifikan secara statistik, namun keterbatasan jumlah sampel dan rendahnya nilai power statistik

mengindikasikan perlunya penelitian lanjutan dengan ukuran sampel lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mosallaei M, Ehtesham N, Rahimirad S, Saghi M, Vatandoost N, Khosravi S. PBMCs: a new source of diagnostic and prognostic biomarkers. *Arch Physiol Biochem.* 2022;128(4):1081-1087. doi:10.1080/13813455.2020.1752257
2. Posevitz-Fejfar A, Posevitz V, Gross CC, et al. Effects of blood transportation on human peripheral mononuclear cell yield, phenotype and function: Implications for immune cell biobanking. *PLoS One.* 2014;9(12). doi:10.1371/journal.pone.0115920
3. Arora M. Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods.* 2023;3. doi:10.13070/mm.en.3.175
4. Syahidah HN, Hadisaputri YE. Review Artikel: Media Yang Digunakan Pada Kultur Sel. 2020;14(3).
5. Zhikhoreva AA, Belik VP, Belashov A V., et al. Spectral Characteristics of the DMEM Cell-Culture Medium. *Technical Physics.* 2018;63(9):1300-1303. doi:10.1134/S1063784218090256
6. Gong S, Fajar P, De Vries-Idema J, Huckriede A. Comparison of media for a human peripheral blood mononuclear cell-based in vitro vaccine evaluation system. *Clin Exp Vaccine Res.* 2023;12(4):328-336. doi:10.7774/cevr.2023.12.4.328
7. Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio Protoc.* 2019;9(1). doi:10.21769/BioProtoc.3128
8. Li X, Zhao Y, Yin J, Lin W. Organic fluorescent probes for detecting mitochondrial membrane potential. *Coord Chem Rev.* 2020;420:213419. doi:10.1016/J.CCR.2020.213419
9. Talluri TR, Bhardwaj A, Mehta SC, Pal Y. Efficacy of evaluation of mitochondrial membrane potential in equine spermatozoa using JC-1. *Indian Journal of Animal Sciences.* 2021;90(12):1599-1601. doi:10.56093/ijans.v90i12.113169
10. Moradi F, Moffatt C, Stuart JA. The effect of oxygen and micronutrient composition of cell growth media on cancer cell bioenergetics and mitochondrial networks. *Biomolecules.* 2021;11(8). doi:10.3390/biom11081177
11. Fu H, Xu J, Wang F, Wang W, Wang Z. High glucose-induced imbalance of mitochondria-associated ER membranes function promotes RSC96 cell damage. *Cell Mol Biol.* 2023;69(7):138-142. doi:10.14715/cmb/2023.69.7.22
12. Antonsen KW, Friis HN, Sorensen BS, Etzerodt A, Moestrup SK, Møller HJ. Comparison of culture media reveals that non-essential amino acids strongly affect the phenotype of human monocyte-derived macrophages. *Immunology.* 2023;170(3):344-358. doi:10.1111/imm.13670