

**EFEK EKSTRAK *Phyllanthus niruri* DALAM
SEDIAAN FITOFARMAKA TERHADAP EKSPRESI
GEN SISTEM IMUN HUMORAL LALAT BUAH
(*Drosophila melanogaster*)**

**THE EFFECT OF *Phyllanthus niruri* EXTRACT IN
PHYTOPHARMACEUTICAL ON GENE EXPRESSION
OF HUMORAL IMMUNE SYSTEM OF FRUIT FLY
(*Drosophila melanogaster*)**

**CHRISTIAN PAKADANG
N111 15 346**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**EFEK EKSTRAK *Phyllanthus niruri* DALAM SEDIAAN
FITOFARMAKA TERHADAP EKSPRESI GEN SISTEM IMUN
HUMORAL LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster*)**

**THE EFFECT OF *Phyllanthus niruri* EXTRACT IN PHYOPHARMACEUTICAL
ON GENE EXPRESSION OF HUMORAL IMMUNE SYSTEM OF FRUIT FLY
(*Drosophila melanogaster*)**

SKRIPSI

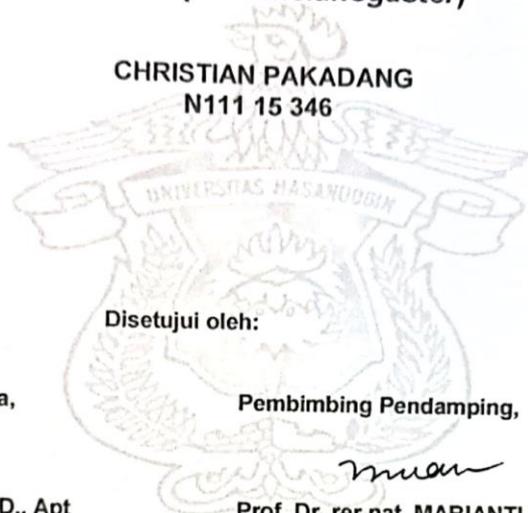
Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi syarat-
syarat untuk mencapai gelar sarjana

**CHRISTIAN PAKADANG
N11115346**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**EFEK EKSTRAK *Phyllanthus niruri* DALAM
SEDIAAN FITOFARMAKA TERHADAP EKSPRESI
GEN SISTEM IMUN HUMORAL LALAT BUAH
(*Drosophila melanogaster*)**

**CHRISTIAN PAKADANG
N111 15 346**



Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

A handwritten signature in black ink, appearing to be "F. Nainu".

**FIRZAN NAINU Ph.D., Apt
NIP: 19820610 200801 1 012**

Pembimbing Pendamping,

A handwritten signature in black ink, appearing to be "M. Manggau".

**Prof. Dr. rer.nat. MARIANTI A. MANGGAU, Apt.
NIP: 19670319 199203 2 002**

Pada Tanggal : 10 November 2020

**EFEK EKSTRAK *Phyllanthus niruri* DALAM SEDIAAN
FITOFARMAKA TERHADAP EKSPRESI GEN SISTEM IMUN
HUMORAL LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster*)**

**THE EFFECT OF *Phyllanthus niruri* EXTRACT IN PHYOPHARMACEUTICAL
ON GENE EXPRESSION OF HUMORAL IMMUNE SYSTEM OF FRUIT FLY
(*Drosophila melanogaster*)**

Disusun dan diajukan oleh :

**CHRISTIAN PAKADANG
N111 15 346**

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal : 28 September 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua : Apt. Firzan Nainu, S.Si.,M.Biomed. Sc.,Ph.D.
2. Sekretaris : Prof.Dr. Apt. rer-nat.Marianti A. Manggau.
3. Anggota : Apt. Usmar S.Si., M.Si.
4. Anggota : Apt. Sumarheni, S.Si., M.Sc.



Mengetahui,

Ketua Program Studi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt
NIP. 19820610 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar adalah hasil karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 25 September 2020

Yang menyatakan,



Christian Pakadang
N111 15 346

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala berkat dan anugerahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “Pengujian Efek Ekstrak *Phyllanthus niruri* Dalam Sediaan Kapsul Fitofarmaka Terhadap Ekspresi Gen Sistem Imun Humoral Lalat Buah (*Drosophila melanogaster*)” ini sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi program S1 pada program studi S1 Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini ada banyak pihak yang terlibat memberikan doa dan dukungan, bantuan bahkan nasehat yang tiada hentinya. Pada kesempatan yang indah ini, izinkan penulis mengucapkan terimakasih khususnya kepada :

Kedua orangtua penulis, Ayahanda Pakadang dan Ibunda Yunita Tiku Sakka' yang senantiasa mendukung penulis, selalu ada dalam setiap kondisi baik suka dan duka, mendukung dalam pemenuhan biaya. Terimakasih untuk cintanya yang tak terhingga kepada penulis..

Penulis juga mengucapkan dengan tulus rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dekan, Wakil Dekan I, Wakil Dekan II Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Dosen Pembimbing penulis, Bapak Apt. Firzan Nainu Ph.D., sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Apt. rer.nat. Marianti A. Manggau, sebagai Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu,

tenaga, pikiran dan ilmunya kepada penulis menyelesaikan skripsi ini.

3. Tim Penguji Bapak Apt Usmar S.Si., M.Si., dan Ibu Apt. Sumarhaeni,S.Si.,M.Sc.yang telah memberikan kritik dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
4. Penasehat Akademik yang terhormat Bapak Drs. Apt. Syaharuddin, M.Si., yang penulis anggap sebagai orangtua dikampus yang senantiasa memberikan bimbingan dan nasehat dari awal perkuliahan hingga penyelesaian tugas akhir.
5. Bapak/Ibu Dosen Fakultas Farmasi yang telah memberikan ilmu, nasehat, dan pengalaman selama penulis menjalani perkuliahan, juga kepada pegawai staf yang telah membantu penulis.
6. Laboran Kak Dewi dan Kak Desi yang telah membantu penulis dalam proses penelitian.
7. Sahabat penulis Alm. Aton, Irwandi, Yunan, Ilham, Ariq.
8. Teman-teman angkatan 2015 “PO15ON” yang telah bersama-sama dengan penulis berjuang untuk meraih mimpi di Fakultas Farmasi.
9. Teman-teman PMKO 2015 yang boleh berbagi kebersamaan, tempat berbagi cerita, menjadi saudara selama penulis menempuh pendidikan dan setia menyemangati penulis., juga PMKO Filadelfia MIPA_Farmasi Universitas Hasanuddin sebagai wadah untuk bersekutu

10. Kawan-kawan UFRG selalu menyediakan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk sama-sama berjuang dalam proses penelitian.
11. Teman-teman Kelompok Tumbuh Bersama (KTB) “AGAPE” yang telah menjadi keluarga penulis saat menempuh pendidikan di Makassar.
12. Sahabat dekat penulis Privendhy, Willy Hardiantho, dan Septian Maraya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga perlu saran dan kritik dari semua pihak. Kiranya skripsi ini dapat memberi manfaat untuk kita semua.

Makassar, September 2020

Christian Pakadang

ABSTRAK

CHRISTIAN PAKADANG. Efek Ekstrak *Phyllanthus niruri* Dalam Sediaan Kapsul Fitofarmaka Terhadap Ekspresi Gen Sistem Imun Humoral Lalat Buah (*Drosophila Melanogaster*). Dibimbing oleh Firzan Nainu dan Marianti A. Manggau.

Salah satu cara untuk menangani infeksi patogen adalah dengan penggunaan antibiotik. Akan tetapi penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi antibiotik. Selain penggunaan antibiotik, imunostimulan dapat digunakan untuk penanganan penyakit infeksi. Namun saat ini penelitian terkait penemuan imunostimulan baru masih sangat kurang akibat keterbatasan hewan model yang digunakan. Untuk mengatasi masalah tersebut maka, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek imunostimulan ekstrak *Phyllanthus niruri* terhadap ekspresi gen sistem imun humoral lalat buah *Drosophila melanogaster*. Pengujian yang dilakukan meliputi pengukuran level mRNA *Drs* dan *Dpt*. Pengukuran level mRNA *Drs* dan *Dpt* dilakukan dengan menggunakan *real-time* PCR untuk melihat apakah sistem imun terstimulasi dengan perlakuan yang diberikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada pengukuran level mRNA *Drs* dan *Dpt*, terlihat bahwa terjadi peningkatan ekspresi gen *Drs* dan *Dpt* pada pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* 0,1%; 1%; dan 5%. Peningkatan ekspresi gen *Dpt* cukup signifikan terhadap grup kontrol sehat terjadi pada pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* 0,1% ($p < 0,05$) tetapi tidak pada konsentrasi 1% dan 5% ($p > 0,05$). Pada pengukuran level ekspresi gen *Drs* pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan grup kontrol sehat ($p > 0,05$).

Kata kunci: imunostimulan, *Drosophila melanogaster*, *Phyllanthus niruri*, *in vivo*

ABSTRACT

CHRISTIAN PAKADANG. The Effect of *Phyllanthus Niruri* Extract In Phitopharmaceutical Capsules On Gene Expression Of Humoral Immune System Of Fruit Fly (*Drosophila Melanogaster*). Supervised by FirzanNainu and Marianti A. Manggau.

One way to deal with pathogenic infections is by using antibiotics. However, improper use of antibiotics could cause antibiotic resistance. In addition to the use of antibiotics, immunostimulants could be used for handling infectious diseases. However, current research related to the discovery of new immunostimulants is still lacking due to the limitations of animal models. To overcome this problem, this study aims to determine the immunostimulatory effect of *Phyllanthus niruri* extract on the expression of the humoral immune system gene of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The tests carried out include measurements of *Drs* and *Dpt* mRNA levels. *Drs* and *Dpt* mRNA level measurements are performed using real time PCR to see whether the immune system is stimulated by the treatment given. The results showed that the measurement of the *Drs* and *Dpt* mRNA levels was increased in administration of *Phyllanthus niruri* extract 0.1%; 1%; and 5%. There was a significant increase in *Dpt* gene expression in the healthy control group in administration of 0.1% *Phyllanthus niruri* extract ($p < 0.05$) but not at concentrations of 1% and 5% ($p > 0.05$). On the measurement of *Drs* gene expression level, *Phyllanthus niruri* extract showed no significant difference with the healthy control group ($p > 0.05$).

Keywords: immunostimulant, *Drosophila melanogaster*, *Phyllanthus niruri*, *in vivo*

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Sistem Imun	4
II.2 Immunostimulan	5
II.3. Klasifikasi <i>Phyllanthus niruri</i>	6
II.4 Morfologi <i>Phyllanthus niruri</i> L.	6
II.5 Kandungan Kimia <i>Phyllanthus niruri</i>	7
II.6 <i>Drosophila melanogaster</i>	7
II.7 Klasifikasi <i>Drosophila melanogaster</i>	8

II.8 Sistem Imun <i>Drosophila melanogaster</i>	9
II.8.1 <i>Toll pathway</i>	9
	Halaman
II.8.2 <i>Imd pathway</i>	12
II.9 <i>Polymerase Chain Reaction</i>	14
II.10 RT-qPCR	15
II.11 Langkah-Langkah PCR	15
BAB III METODE PENELITIAN	
III.1 Alat dan Bahan	17
III.2 Penyiapan Hewan Uji	17
III.3 Pembuatan Pakan <i>Drosophila melanogaster</i>	17
III.4 Pembuatan Pakan Stimuno® 0,1%, 1%, dan 5%	18
III.5 Isolasi RNA	19
III.6 Desain Primer	20
III.7 Analisis PCR	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
IV.1.1 Hasil Desain Primer	21
IV.1.2 Hasil Pengukuran Level mRNA	23
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1 Kesimpulan	26
V.2 Saran	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Primer <i>drs, dpt, dan rp49</i>	20

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Jalur mekanisme aktivasi <i>Toll signaling pathway</i>	12
2. Jalur sinyal sistem imun <i>Drosophila melanogaster Imd pathway</i> dan <i>Toll pathway</i>	13
3. Plot amplifikasi jumlah produk yang terbentuk pada proses PCR	
4. Sekuens lengkap gen <i>Drs</i> dan lokasi primer <i>Drs_qPCR forward dan reverse</i>	21
5. Sekuens lengkap gen <i>Drs</i> dan lokasi primer <i>Drs_qPCR forward dan reverse</i>	21
6. Sekuens lengkap gen <i>Drs</i> dan lokasi primer <i>Drs_qPCR forward dan reverse</i>	22
7. Sekuens lengkap gen <i>Dpt</i> dan lokasi primer <i>Dpt_qPCR forward dan reverse</i>	23
8. Sekuens lengkap gen <i>Dpt</i> dan lokasi primer <i>Dpt_qPCR forward dan reverse</i>	23
9. Sekuens lengkap gen <i>Dpt</i> dan lokasi primer <i>Dpt_qPCR forward dan reverse</i>	24
10. Sekuens lengkap gen <i>Dpt</i> dan lokasi primer <i>Dpt_qPCR forward dan reverse</i>	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Skema Kerja <i>Survival Assay</i>	30
2. Skema Kerja Isolasi RNA	31
3. Skema Kerja Pembuatan Pakan <i>Drosophila melanogaster</i>	31
4. Penimbangan Kapsul Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> Fitofarmaka	31
5. Pembuatan Pakan Yang Mengandung Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> 0,1%; 1%; dan 5%	32
6. Komposisi Pakan	32
7. Gambar Alat-Alat Penelitian	33
8. Gambar hasil PCR	34

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Sistem imun merupakan mekanisme pertahanan tubuh untuk melawan patogen yang menginfeksi tubuh. Ketika sistem imun gagal untuk mengeliminasi patogen yang menginfeksi tubuh maka patogen akan menyebabkan *host* menjadi sakit (Murphy *et al.* 2008). Salah satu cara untuk menangani infeksi patogen adalah dengan penggunaan antibiotik. Akan tetapi penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi antibiotik (Shallcross and Davies, 2014). Selain penggunaan antibiotik, imunostimulan dapat digunakan untuk penanganan penyakit infeksi (Felippe *et al.* 2014). Imunostimulan dapat mengaktifkan ataupun menginduksi komponen-komponen sistem imun (Jantan *et al.* 2015), dengan cara memperbesar efek dari respon imun termasuk proses fagositosis, pelepasan sitokin, dan produksi antibodi sehingga sistem imun dapat melawan infeksi (Hadden, 1993).

Salah satu imunostimulan yang telah teruji secara pra-klinis dan klinis adalah Stimuno[®]. Kandungan yang terdapat dalam Stimuno[®] adalah ekstrak *Phyllanthus niruri*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Eze *et al.* (2014) diperoleh hasil bahwa ekstrak *Phyllanthus niruri* dapat menginduksi sistem imun bawaan dan adaptif dari tikus. Selain itu, penelitian yang dilakukan Nworu *et al.* (2010) memperoleh hasil bahwa

ekstrak *Phyllanthus niruri* dapat menstimulasi makrofag sehingga akan meningkatkan pelepasan TNF- α secara *in-vitro*.

Sistem imun mamalia memiliki homologi atau kemiripan yang besar dengan sistem imun lalat buah *Drosophila melanogaster*. *Toll pathway* pada *D. melanogaster* homolog dengan *Toll-like pathway* pada sistem imun mamalia dan *Immune deficiency pathway (Imd)* homolog dengan jalur TNF- α pada sistem imun mamalia (Buchon *et al.* 2014; Sheehan *et al.* 2018). *D. melanogaster* memiliki 3 jalur respon sistem imun, dua diantaranya adalah jalur respon sistem imun utama yaitu *Toll pathway* dan *Immune deficiency pathway (Imd)*. *Toll pathway* menghasilkan *drosomycin* yang memiliki fungsi dalam melawan infeksi akibat fungi dan bakteri Gram positif. *Immune deficiency pathway (Imd)* menghasilkan *dipterocin* yang memiliki fungsi dalam membunuh bakteri Gram negatif (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Drosophila melanogaster merupakan organisme model yang saat ini mulai banyak digunakan oleh peneliti di dunia. Hewan ini mudah untuk dipelihara, murah, dan efisien. Selain itu, *D. melanogaster* telah ditetapkan sebagai salah satu organisme model yang dapat digunakan untuk mempelajari sistem imun melalui identifikasi jalur ekspresi gen AMP (*antimicrobial peptide*) dan respon imun secara humoral (Nainu, 2018). Berdasarkan hal tersebut, lalat buah *D. melanogaster* berpotensi untuk dijadikan organisme model dalam penemuan kandidat imunomodulator beserta penelusuran mekanisme aksinya.

I.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* (Stimuno®) terhadap ekspresi gen sistem imun *Drosophila melanogaster*?

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak *Phyllanthus niruri* (Stimuno®) terhadap ekspresi gen sistem imun *Drosophila melanogaster* berdasarkan parameter level ekspresi gen *Drs* (*Toll pathway*) dan *Dpt* (*Immune deficiency pathway*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Sistem Imun

Sistem imun terdiri atas organ, sel, dan molekul yang memiliki fungsi untuk menjaga homeostasis tubuh serta menjaga tubuh dari serangan patogen seperti virus, bakteri, parasite, dan fungi. Berdasarkan fungsinya, sistem imun dapat dikategorikan menjadi 2 kelompok yaitu: sistem imun bawaan (sistem imun non-spesifik) dan sistem imun adaptif (sistem imun spesifik) (Jantan, 2015).

Sistem imun nonspesifik berupakomponen normal tubuh, selalu ditemukan pada individu sehat dan siap mencegah mikroba masuk ke dalam tubuh dan dengan cepat menyingkirkannya. Sistem imun nonspesifik tidak spesifik terhadap mikroba atau patogen tertentu dan telah ada sejak lahir. Sistem imun nonspesifik merupakan pertahanan terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroba dan dapat memberikan respons langsung. Sistem imun nonspesifik terdiri atas pertahanan fisik/mekanik, pertahanan biokimia, pertahanan humoral, dan pertahanan seluler (Bratawidjaja, 2009).

Sistem imun alamiah atau juga disebut dengan sistem imun spesifik memiliki kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali terpajan dengan tubuh akan dikenali oleh sistem imun spesifik. Paparan tersebut akan menimbulkan

sensitasi, sehingga antigen yang sama dan masuk tubuh untuk kedua kali akan dikenal lebih cepat dan kemudian dihancurkan. Sistem imun spesifik terdiri atas sistem imun humoral dan sistem imun spesifik. Pada sistem imun humoral, sel B merupakan pertahanan utama. Sel B akan diaktivasi dengan adanya stimulan berupa benda asing. Ketika sel B diaktivasi, sel B akan berproliferasi, berdiferensiasi, dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Fungsi utama dari antibodi ialah pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler, virus dan bakteri serta menetralkan toksinnya. Pada sistem imun spesifik sel T merupakan sistem pertahanan utama. Sel T dibentuk di dalam sumsum tulang, tetapi proliferasi dan diferensiasinya terjadi di dalam kelenjar timus. Sel T terdiri atas beberapa subset sel dengan fungsi yang berbeda satu sama lainnya yaitu sel CD4⁺ (Th1, Th2), CD8⁺ atau CTL dan sel Tr. Fungsi utama sistem imun spesifik adalah pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraseluler, jamur, dan virus. Sel CD4⁺ akan mengaktifkan sel Th1 yang selanjutnya mengaktifkan makrofag untuk menghancurkan mikroba. Sel CD8⁺ memusnahkan sel yang terinfeksi (Bratawidjaja, 2009).

II.2 Imunostimulan

Imunostimulan adalah senyawa yang dapat mengaktifasi sistem imun terutama sistem imun alamiah serta meningkatkan pelepasan mediator endogen imun seperti sitokin sebagai terapi untuk mengatasi imunodefisiensi, infeksi kronik ataupun kanker. Imunostimulan menginduksi aktivasi sistem imun nonspesifik serta memperbesar efek

dari sistem imun termasuk fagositosis, *Antigen Presenting Cell (APC)*, aktivitas anti viral dan sitotoksik, pelepasan sitokin, serta produksi antibody (Felippe, 2014).

II.3 Taksonomi *Phyllanthus niruri L.*

Tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri L.*) memiliki taksonomi sebagai berikut (Thomas, 2007):

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Euphorbiales*
Famili : *Euphorbiaceae*
Genus : *Phyllanthus*
Spesies : *Phyllanthus niruri L.*

II.4 Morfologi *Phyllanthus niruri L.*

Meniran merupakan tanaman herba dan tumbuh tegak, batangnya tidak bergetah, berbentuk bulat, bercabang dan berwarna hijau. Tinggi batangnya kurang dari 50 cm. Daunnya bersirip dengan berjumlah genap. Setiap tangkai terdiri dari daun majemuk berukuran kecil yang berbentuk bulat telur. Panjang daun sekitar 5 mm, sedangkan lebarnya 3 mm, dibagian bawah daun terdapat bintik berwarna kemerahan. Bunganya berwarna putih kehijauan, melekat pada ketiak daun dan menghadap kebawah. Buah meniran berbentuk bulat pipih, berdiameter 2 – 2,5 cm dan bertekstur licin, bijinya seperti bentuk ginjal, keras, dan berwarna coklat,

akarnya berbentuk tunggang dan berwarna putih kekuningan.

Meniran mempunyai bunga jantan dan betina yang berwarna putih, bunga jantan keluar di bawah ketiak daun, sedangkan bunga betina keluar di atas ketiak daun. Perbanyakan tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dapat dilakukan dengan menggunakan biji. Tumbuhan ini tumbuh subur di tempat yang lembab pada ketinggian 1000m diatas permukaan laut. Pada umumnya meniran tidak dipelihara karena dianggap tanaman liar (Thomas, 2007).

II.5 Kandungan Kimia *Phyllanthus niruri* L.

Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) banyak mengandung beberapa senyawa bioaktif antara lain: flavonoid, terpenoid, alkaloid, polifenol, kumarin, saponin, tannin, *corilagin*, *geraniin*, *phyllanthin*, *ellagic acid*, *niranthin*, katekin, quercetin, dan astragalin. Diantara senyawa kimia tersebut, katekin, quercetin, dan astragalin memiliki aktivitas biokimia dalam meregulasi sistem imun (Robinson, 1995; Jantan *et al.* 2019).

II.6 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster merupakan hewan yang tidak bertulang belakang serta memiliki ukuran sekitar 3 mm (Nainu, 2018). Seperti pada serangga lainnya, *D. melanogaster* memiliki 3 bagian tubuh yaitu: bagian kepala, *thorax*, dan abdomen. Dalam membedakan hewan jantan dan betina pada *D. melanogaster* cukup mudah dilakukan. Ukuran lalat betina umumnya lebih besar daripada lalat jantan. Dari segi warna, lalat jantan memiliki warna hitam sedangkan pada lalat betina tidak terlalu hitam.

Drosophila melanogaster telah banyak digunakan untuk mempelajari penyakit pada manusia. Hingga saat ini, *D. melanogaster* telah digunakan secara luas untuk menjelaskan fenomena biologis yang juga terdapat pada manusia seperti proses apoptosis dan fagositosis dalam perkembangan imunitas, pengaruh nutrisi pada fungsi biologis serta umur individu, hingga makna gangguan cacat genetika (Nainu, 2018).

Ada banyak alasan mengapa *Drosophila melanogaster* banyak digunakan sebagai hewan model, antara lain: lalat buah sangat mudah untuk dipelihara dibandingkan hewan lain seperti *zebrafish*, mencit, ataupun tikus, proses perkembangbiakannya cukup cepat, serta tidak memerlukan kode etik dalam penggunaannya (Nainu, 2018; Pandey *et al.*, 2011).

Secara genetik *Drosophila melanogaster* memiliki homologi sebesar 60% dengan manusia, serta 75% dari gen yang berhubungan dengan penyakit pada manusia memiliki homologi dengan gen pada *D. melanogaster*.

II.7 Taksonomi *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster memiliki taksonomi sebagai berikut (Lilies 2014):

Kingdom : Animalia
Filum : Arthropoda
Kelas : Insecta
Ordo : Diptera

Famili : Drosophildae
Genus : *Drosophila*
Spesies : *Drosophila melanogaster*

II.8 Sistem Imun *Drosophila melanogaster*

Sistem imun *Drosophila melanogaster* dibagi atas dua yaitu sistem imun seluler dan sistem imun humoral (Elrod-Erickson *et al.*; Royet *et al.*, 2003). Adapun sistem imun seluler *D. melanogaster* terdiri atas lamellosit, plasmatosit, dan sel-sel kristal. 90%-95% hematosit terdiri atas plasmatosit. Sel ini memiliki fungsi dalam memfagositosis sel-sel mati serta mikroba patogen. Lamellatosit berukuran relatif lebih besar serta pipih dan memiliki fungsi utama dalam membungkus dan menetralkan benda asing yang terlalu besar untuk difagositosis. 5% dari hemosit adalah sel kristal. Sel ini tidak memiliki fungsi fagositosis dan berperan dalam proses melanisasi (Lemaitre *et al.* 2007).

Pada sistem imun humoral *Drosophila melanogaster* terdapat banyak jalur sistem imun, beberapa diantaranya memiliki homologi dengan sistem imun pada manusia. Adapun jalur tersebut sebagai berikut:

II.8.1 Toll pathway

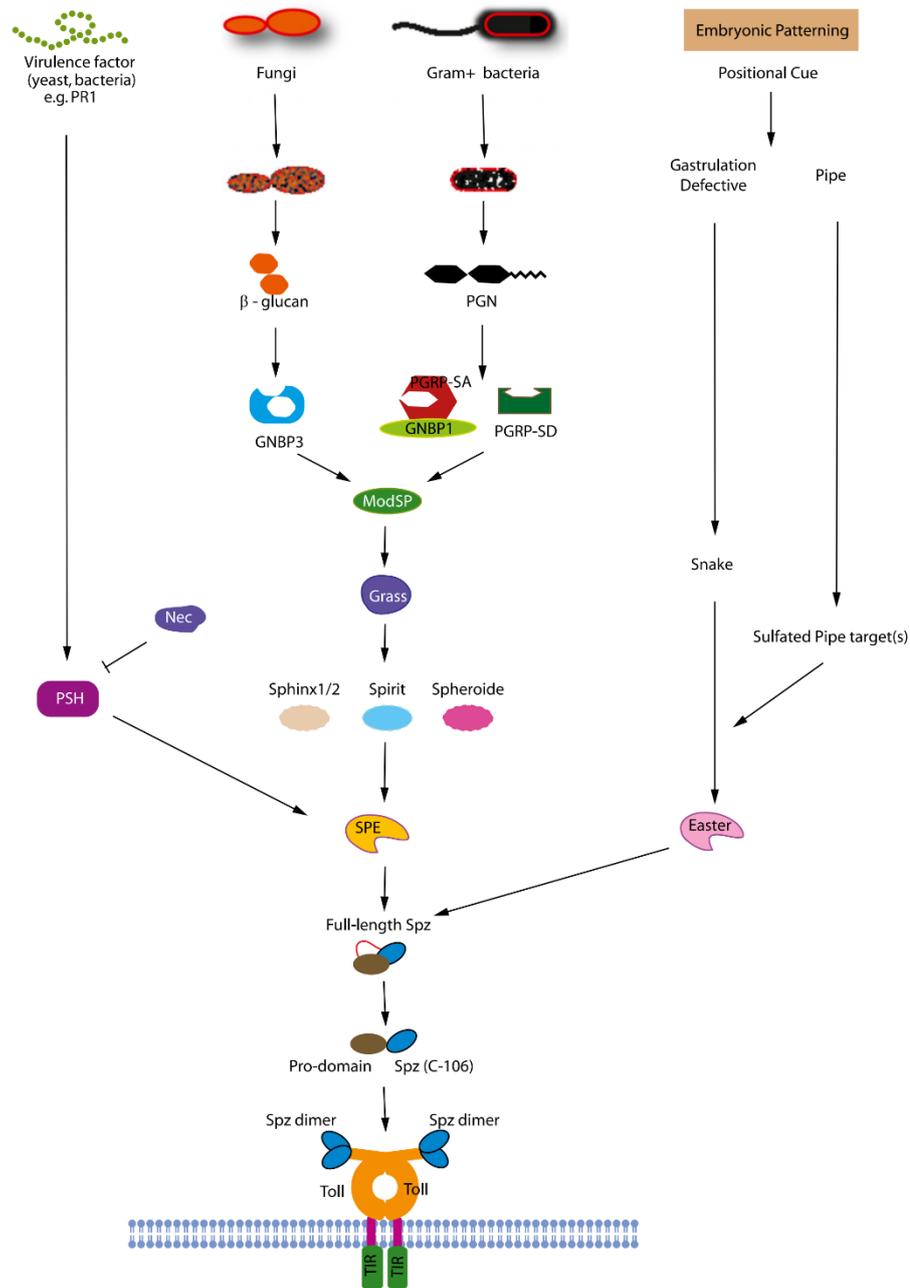
Pada lalat buah *Drosophila melanogaster* reseptor *Toll* merupakan reseptor yang esensial dalam proses perkembangan embrionik dan imunitas lalat buah. Terdapat 9 reseptor *Toll* yang dikode oleh genom *Drosophila melanogaster* termasuk reseptor *Toll* pada *Toll pathway*. Induksi pada *Toll pathway* oleh bakteri Gram positif atau fungi akan

mengakibatkan aktivasi imunitas seluler serta produksi beberapa peptida antimikroba seperti *Drosomycin*. Reseptor *Toll* akan diaktivasi ketika ligan *Spaetzle* terikat pada reseptornya dan mengaktifkan faktor NF- κ B *Dorsal-related immunity faktor* (Valenne *et al.* 2011).

Drosomycin merupakan target utama dari respon humoral *Toll*. *Toll pathway* juga memiliki peran dalam respon imun seluler termasuk pada proses fagositosis mikroba serta enkapsulasi dan membunuh parasit. Aktivasi *Toll pathway* dimulai dari pengenalan ekstraseluler yang kemudian menginisiasi kaskade protease yang mengarah ke aktivasi reseptor *Toll*. Dalam kondisi non-*signaling*, prodomain dari *Spaetzle* menutupi daerah C-terminal *Spaetzle* yang sebagian besar bersifat hidrofobik. Aktivasi akan menginduksi proteolisis yang mengakibatkan perubahan konformasi *Spaetzle*. Menariknya, prodomain tetap terkait dengan terminal C dan hanya dilepaskan ketika domain ekstraseluler *Toll* berikatan dengan kompleks. Ada dua model molekul *Spaetzle* terikat dengan reseptornya, yang pertama adalah satu dimer *Spaetzle* berikatan dengan dua reseptor *Toll*. Yang kedua adalah setiap molekul dimer *Spaetzle* akan terikat pada satu dari dua reseptor *Toll*, sehingga akan memicu perubahan konformasi dan mengaktifkan pernsinyalan intraseluler (Valenne *et al.* 2011).

Setelah molekul *Spaetzle* terikat pada reseptor *Toll*, reseptor *Toll* akan terikat ke protein adaptor MyD88 secara intraseluler pada domain TIR. Selama proses ini berlangsung *MyD88*, *Tube*, kinase *Pelle*, dan

sebuah protein adaptor akan bergabung dan membentuk kompleks heterotrimerik *MyD88-Tube-Pelle* melalui interaksi *death domain (DD)-mediated*. Dari kompleks oligomeric *MyD88-Tube-Pelle*, sinyal berlanjut ke fosforilasi dan degradasi faktor I κ B Cactus *Drosophila*. Pada kondisi normal, *Cactus* akan terikat pada faktor transkripsi NF- κ B *Dorsal* atau *Dif* kemudian menghambat aktivitasnya sehingga *nuclear translocation Dorsal* dan *Dif* membutuhkan degradasi molekul *Cactus*. Untuk dapat dapat terdegradasi, molekul *Cactus* harus difosforilasi. Setelah proses fosforilasi, *nuclear translocation Dorsal/Dif* akan mengaktifasi proses transkripsi beberapa target gen (Valenne, 2011).

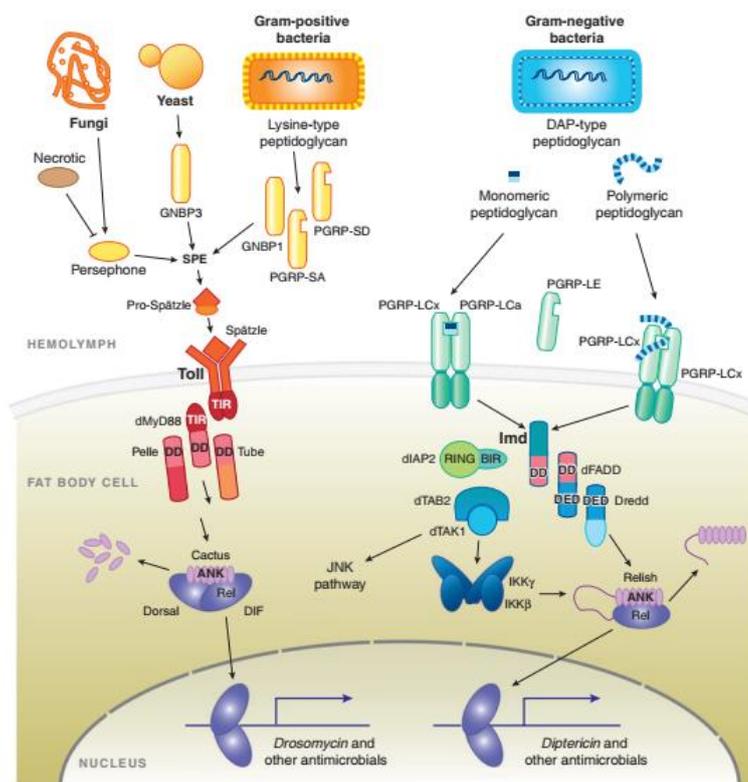


Gambar 1. Jalur mekanisme aktivasi *Toll signaling pathway*

II.8.2 *Imd pathway*

Imd pathway adalah salah satu jalur imunitas pada *Drosophila melanogaster* yang memiliki peranan yang sangat penting untuk melawan

bakteri. *Imd pathway* memiliki fungsi untuk melawan bakteri Gram negatif. Jalur *Imd* akan diaktivasi oleh tipe peptidoglikan DAP (*meso-diaminopimelic acid*) yang umumnya terdapat pada dinding sel bakteri Gram negative. Terdapat 2 reseptor penting yang berperan pada jalur *Imd*, PGRP-LC pada membrane plasma dan PGRP-LE terdapat pada bagian intraseluler. Ketika peptidoglikan DAP terikat pada reseptor maka jalur NF- κ B akan diinisiasi dan menginduksi sekresi peptide antimikroba (Kleino, *et al.* 2015).

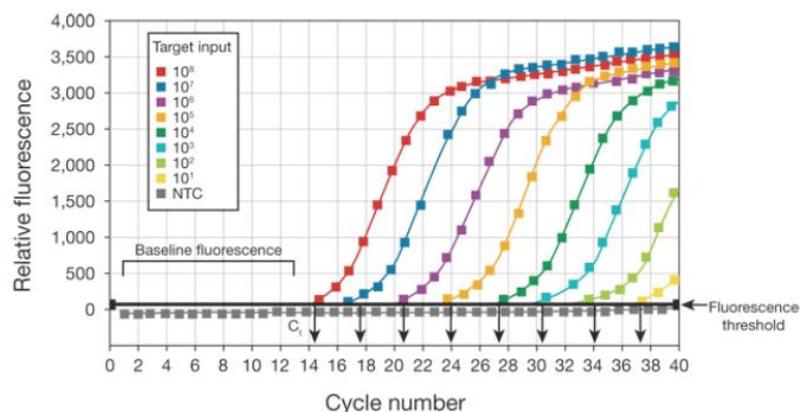


Gambar 2. Jalur sinyal sistem imun *Drosophila melanogaster* *Imd pathway* dan *Toll pathway*

II.9 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu teknologi yang sangat maju pada bidang biologi molekular. Dengan menggunakan PCR, sekuens spesifik DNA atau cDNA dapat digandakan atau diamplifikasi menjadi ribuan atau jutaan dengan sekuens oligo-nukleotida spesifik, DNA *Polymerase*, dan siklus temperature yang sesuai. Secara teoretis, PCR akan mengamplifikasi DNA secara *exponensial*, dengan menggandakan jumlah molekul target setiap pada siklus amplifikasi .

Pada *Real-Time* PCR jumlah DNA yang teramplifikasi akan diukur setiap siklus dengan indikator fluoresensi. Perubahan intensitas fluoresensi selama reaksi akan dideteksi oleh detector dalam PCR. Dengan mem-plot intensitas fluoresensi dengan jumlah siklus maka *Real-Time* PCR akan membuat plot amplifikasi jumlah produk dan lamanya waktu reaksi.



Gambar 3. Plot amplifikasi jumlah produk yang terbentuk pada proses PCR

Adapun keuntungan penggunaan *Real-Time* PCR yaitu: kemampuan untuk memonitor reaksi yang sedang terjadi secara *real-time*, memiliki kemampuan untuk mengukur jumlah ampikon dengan tepat pada

setiap siklus sehingga memungkinkan kuantifikasi jumlah *starting material* yang diukur, proses amplifikasi dan deteksi terjadi dalam satu tabung sehingga proses manipulasi setelah PCR tidak mungkin dilakukan (Real-time PCR handbook, 2014).

II.10 RT-qPCR

PCR merupakan proses penggandaan DNA secara *in-vitro*. Agar dapat diamplifikasi sampel RNA harus diubah menjadi DNA dengan *reverse-transcription*. *Reverse-transcription* mengubah RNA menjadi *complementary DNA* atau cDNA menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Enzim ini membutuhkan primer agar dapat menguak RNA menjadi cDNA. Primer yang umumnya digunakan adalah primer oligo(dT) ataupun primer yang spesifik dengan target yang diinginkan. Proses *reverse-transcription* dilakukan pada 40°C-50°C (Real-time PCR handbook, 2014).

II.11 Langkah-Langkah PCR

Terdapat 3 langkah utama dalam setiap siklus PCR pada setiap reaksi yang terjadi. Reaksi umumnya terdiri atas 40 siklus yaitu (Real-time PCR handbook, 2014):

a. Denaturasi

Denaturasi merupakan proses inkubasi pada suhu tinggi yang memungkinkan untai DNA dapat terpisah membentuk *single stranded DNA* serta melonggarkan struktur sekunder pada *single stranded DNA*.

Suhu tertinggi yang digunakan pada reaksi ini umumnya bergantung pada DNA Polimerase (umumnya 95°C).

b. Annealing

Pada reaksi ini sekuens DNA akan mengalami hibridisasi. Suhu yang digunakan pada tahap ini bergantung pada suhu leleh primer yang digunakan (umumnya 5°C dibawah suhu leleh primer)

c. Ekstension

Pada suhu 70°C-72°C DNA polymerase akan mulai bekerja secara optimal dengan kecepatan 100 basa per-detik. Ketika jumlah ampikon yang dihasilkan sedikit, maka tahap ini biasanya digabungkan dengan tahap annealing dengan suhu 60°C.