

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas adalah kondisi saat tubuh mengalami kelebihan berat badan dari standar normal. Kondisi ini dapat diakibatkan karena adanya penimbunan jaringan lemak tubuh yang berlebihan (Annurullah *et al.*, 2021). Obesitas juga termasuk salah satu penyakit *non-communicable disease* (NCD) atau biasa disebut penyakit tidak menular yang memerlukan perhatian khusus (Octaviany, 2021). Berdasarkan data WHO, pada tahun 2022 lebih dari 1 juta orang di dunia mengalami obesitas. Data ini juga menunjukkan bahwa 43% orang dewasa mengalami kelebihan berat badan pada tahun 2022 (WHO, 2024). Berdasarkan data SKI (Survei Kesehatan Indonesia) tahun 2023, prevalensi penduduk dewasa (>18 tahun) yang mengalami obesitas yaitu 23,2-23,6% (SKI, 2023). Sementara itu, WHO menargetkan sebanyak 25% pengurangan kasus kematian dini untuk jenis kematian yang diakibatkan oleh NCD atau penyakit tidak menular (WHO, 2024).

Obesitas pada orang dewasa dapat menjadi faktor risiko utama penyebab penyakit, seperti penyakit kardiovaskular, kanker, diabetes, dan osteoarthritis yang banyak menyebabkan kasus kematian dini (WHO, 2024). Selain itu, kondisi obesitas yang terjadi pada manusia dapat memicu timbulnya respon inflamasi kronik (*low-grade inflammation*) dan mengaktivasi respon imun (Galikova & Klepsatel, 2018). Obesitas dapat menyebabkan timbulnya respon inflamasi akibat adanya penumpukan lemak berlebih yang mendorong terjadinya peningkatan stress oksidatif (Paula *et al.*, 2016).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan dalam mencegah dan mengatasi masalah obesitas adalah dengan memanfaatkan potensi bahan alam seperti tanaman sambiloto (Saputra, 2021). Sambiloto (*Andrographis paniculata*) adalah salah satu tanaman di Indonesia yang dapat digunakan sebagai obat tradisional. Sambiloto memiliki kandungan senyawa andrografolid yang merupakan senyawa terbanyak dan paling aktif pada tanaman sambiloto jika dibandingkan dengan senyawa lainnya (Saputra, 2021). Pada penelitian sebelumnya yang menggunakan hewan coba berupa tikus, dilaporkan bahwa andrografolid memiliki efek anti-obesitas pada tikus yang telah diberi *high fat diet* (HFD) (Chen *et al.*, 2016). Selain itu, pada penelitian lain ditemukan bahwa andrografolid juga dapat berperan sebagai senyawa antiinflamasi dengan mekanisme penghambatan pada jalur signaling NF-kB (Zhang *et al.*, 2021). Namun,



penghambatan inflamasi tersebut masih belum ditelusuri lebih lanjut dengan senyawa andrografolid terhadap *D. Melanogaster* yang tip obesitas. Oleh karena itu, potensi antiobesitas pada sambiloto lebih lanjut kaitannya dengan respon inflamasi.

Dalam penelitian-penelitian mengenai potensi sambiloto yang telah dilakukan sebelumnya, digunakan hewan coba seperti tikus ataupun mencit. Namun, Seiring dengan meningkatnya kepedulian manusia terhadap kesejahteraan hewan, pengujian dan penggunaan hewan seperti mamalia mulai dibatasi (Nainu *et al.*, 2018). Adapun salah satu hewan coba yang juga dapat digunakan dalam pengujian potensi bahan alam termasuk sambiloto adalah lalat buah (*D. melanogaster*). *D. melanogaster* memiliki 60% gen yang homolog dengan manusia dan sebanyak 75% gen homolog terkait dengan penyakit pada manusia termasuk obesitas serta komplikasi metabolit yang terkait (Miryozan *et al.*, 2019; Baenas *et al.*, 2022). *D. melanogaster* adalah hewan coba yang dapat digunakan sebagai model untuk penyakit metabolik atau penyakit yang berhubungan dengan pola makan (Galikova & Klepsatel, 2018). Berdasarkan hal tersebut, *D. melanogaster* dapat digunakan dalam pengujian *in vivo* untuk senyawa yang memiliki potensi anti-obesitas.

Pada *D. melanogaster* terdapat gen *dpt* dan *drs* yang merupakan gen yang mewakili sistem imun pada jalur Toll dan Imd serta termasuk gen yang homolog dengan jalur NF- κ B pada manusia (Buchon *et al.*, 2014). HFD yang diberikan pada *D. melanogaster* dapat menginduksi fenotip obesitas atau disfungsi metabolik (Baenas *et al.*, 2022). Adanya pemberian pakan HFD pada *D. melanogaster* juga dapat menyebabkan aktivasi pada jalur IMD/NF- κ B serta meningkatkan trigliserida dan perubahan homeostasis (Wang *et al.*, 2024). Jalur NF- κ B akan teraktivasi dengan adanya proses stres oksidatif akibat peningkatan asam lemak dari HFD. Aktivasi jalur tersebut akan meningkatkan produksi *antimicrobial peptides* (AMPs). Gen AMP yang terdapat pada *D. melanogaster* yaitu *dpt* dan *drs* (Yu *et al.*, 2022). Dengan demikian, ekspresi gen *drs* dan *dpt* pada *D. melanogaster* dapat memberikan gambaran terkait pengaruh ekstrak sambiloto terhadap respon inflamasi yang ditimbulkan dari fenotip obesitas pada lalat buah.

Berdasarkan penjelasan di atas, maka, pada penelitian ini akan dilakukan pengujian mengenai pengaruh ekstrak sambiloto sebagai kandidat antiobesitas menggunakan model *D. melanogaster* yang memiliki fenotip obesitas dengan mengamati adanya perubahan ekspresi gen sitokin pro-inflamasi (*drs* dan *dpt*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini, yaitu bagaimana pengaruh ekstrak sambiloto terhadap ekspresi gen sitokin pro-inflamasi (*drs* dan *dpt*) pada model obesitas *D. melanogaster*?



1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, maka tujuan dari penelitian ini, yaitu untuk mengetahui pengaruh ekstrak sambiloto terhadap ekspresi gen sitokin pro-inflamasi (*drs* dan *dpt*) pada model obesitas *D. melanogaster*.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain, yaitu alat-alat gelas (Pyrex®), kompor listrik S-302 (Maspion®), *micropestle* (Geneaid®), mikropipet (Dragonlab®), oven, *plugs Drosophila* (Biologix®), *rotary evaporator* (Heidolph®) spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu®), *spin cartridge* (Invitrogen™), *thermal cycler* qPCR (RotorGene Q®, Qiagen®), timbangan analitik (Ohaus®) dan vial.

2.1.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain, yaitu agar (Swallow®), *aluminium foil*, asam propionat, *aquadest*, *brewer's yeast*, *D. melanogaster w¹¹¹⁸*, ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*), etanol 70%(Onemed®), gula (Gulaku®), metil paraben, larutan NaCl (Otsuka®), *Purelink™ Mini Kit* (Invitrogen TM), primer *rp49*, primer *drs*, primer *dpt*, reagen CHOD-PAP (Glory diagnostic®), tepung jagung, *treff tube* (Treff lab®), dan *virgin coconut oil* (VCO).

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Ekstraksi

Proses ekstraksi daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) diawali dengan mengumpulkan daun sambiloto lalu di cuci hingga bersih dan dikeringkan lalu dilakukan sortasi kering. Setelah itu, dihaluskan hingga membentuk partikel kecil dan dilanjutkan dengan proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Simplisia sebanyak 400 gram dimaserasi menggunakan 10 L pelarut etanol 70% selama 3 x 24 jam. Simplisia yang dimaserasi sesekali diaduk pada waktu yang sama selama 3 hari. Setelah itu, hasil maserasi disaring dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Azizah *et al.*, 2022; Riyo *et al.*, 2019).

2.2.2 Penyiapan hewan uji *D. melanogaster*

Hewan uji yang digunakan adalah lalat buah (*D. melanogaster*) *w¹¹¹⁸* yang diperoleh dari stok laboratorium Farmakologi-Toksikologi, Universitas Hasanuddin. *D. melanogaster* dipelihara dengan menjaga suhu ruang pada suhu 25°C dan kelembapan 60% pada siklus siklus gelap/terang per 12 jam. *D. melanogaster* yang digunakan pada penelitian ini merupakan lalat buah jantan yang berusia 3-5 hari.



2.2.3 Pembuatan pakan standar *D. melanogaster*

Pada pembuatan 100 mL pakan standar, pertama dilakukan penimbangan pada bahan, yaitu 7,5 gram tepung jagung, 2,5 gram *brewer's yeast*, 0,9 gram agar, dan 4,5 gram sukrosa atau gula pasir. Semua bahan ditimbang menggunakan timbangan analitik. Setelah itu, bahan-bahan dicampurkan dalam gelas beaker dan dicukupkan dengan 100 mL air suling. Campuran bahan pakan kemudian dipanaskan menggunakan kompor listrik hingga mencapai kekentalan yang diinginkan. Setelah kental, campuran pakan didiamkan sejenak lalu ditambahkan 400 μ L asam propionat dan 450 μ L metil paraben menggunakan mikropipet kemudian diaduk. Hasil campuran pakan lalu dimasukkan ke dalam masing-masing vial yang telah disterilkan lalu dibiarkan memadat selama 24 jam.

2.2.4 Pembuatan pakan *high fat diet* (HFD)

Pembuatan pakan HFD dilakukan dengan menambahkan *virgin coconut oil* (VCO) ke pakan standar. VCO memiliki keunggulan yaitu lebih mudah diserap, mudah dicerna dan diangkut sebagai sumber energi. Dari penelitian sebelumnya, disebutkan bahwa VCO dapat meningkatkan berat badan pada *D. melanogaster* secara signifikan pada generasi pertama. VCO ditambahkan pada campuran pakan standar sebelum dimasukkan pada vial (Pertiwi *et al.*, 2024). Perbandingan komposisi pakan standar dan HFD (dalam 100 mL) ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan komposisi pakan *D. melanogaster*

Bahan	Komposisi	
	Pakan standar	<i>high fat diet</i> (HFD)
Tepung jagung	7,5 g	7,5 g
Yeast	2,5 g	2,5 g
Agar	0,9 g	0,9 g
Gula	4,5 g	4,5 g
VCO	0	2 mL
Asam propionat	400 μ L	400 μ L
Metil paraben	450 μ L	450 μ L
Air mineral	Ad 100 mL	Ad 100 mL

2.2.5 Uji *in vivo* ekstrak sambiloto pada *D. melanogaster* dengan fenotip obesitas

Pada pengujian efek ekstrak sambiloto terhadap *D. melanogaster* yang diinduksi pakan HFD, dilakukan beberapa pembagian kelompok perlakuan.



kelompok perlakuan yang diamati, yaitu kontrol tanpa perlakuan berupa pakan standar, pakan HFD, dan tiga perlakuan pakan HFD ekstrak sambiloto dengan konsentrasi masing-masing yaitu 0,04%, 0,08%, dan 0,16%. Untuk membuat konsentrasi ekstrak 0,04%, 0,08%, dan

0,16% masing-masing dicuplik 60 μ L, 120 μ L, dan 240 μ L dari larutan stok ekstrak sambiloto 33,33% menggunakan mikropipet lalu dimasukkan ke dalam pakan HFD (50 mL).

2.2.6 Pengukuran kadar kolesterol larva *D. melanogaster*

Pengukuran kadar kolesterol dilakukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh pertiwi *et al.* (2024) dengan beberapa modifikasi. Metode pengukuran diawali dengan menghancurkan 10 larva *D. melanogaster* dari masing-masing vial perlakuan menggunakan *micropestle* di dalam *treff tube*. Setelah itu larva yang telah dihancurkan ditambahkan isopropanol hingga 0,5 mL. Selanjutnya tube disentrifuge dengan kecepatan 1000 *rpm* selama 10 menit dengan suhu 4°C. Hemolimfa dari *D. melanogaster* selanjutnya diambil dan dipindahkan ke dalam *treff tube* lainnya sebelum ditambahkan reagen. Reagen CHOD-PAP ditambahkan pada larutan sampel, larutan blanko, dan larutan standar lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

2.2.7 Uji *crawling* pada larva *D. melanogaster*

Uji *crawling* pada *D. melanogaster* dilakukan dengan mengamati pergerakan larva dari masing-masing vial perlakuan. Dalam pengujian ini, digunakan larva instar tiga yang kemudian di letakkan dalam cawan petri yang telah berisi agar. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah pergerakan larva selama satu menit pada cawan petri yang diletakkan di atas kertas milimeter block (*graph paper*) lalu dibandingkan dengan larva pada kelompok kontrol (Nayak & Mishra, 2021).

2.2.8 Penyiapan sampel RNA dan analisis ekspresi gen *drs* dan *dpt*

Proses isolasi sampel RNA larva dilakukan menggunakan *Purelink™ Mini Kit* (Invitrogen TM). Pada setiap kelompok vial perlakuan diambil 10 larva instar tiga yang masih hidup lalu dimasukkan dalam *treff tube* untuk diproses. Sebelum dilakukan proses isolasi RNA, dilakukan penyiapan larutan *lysis buffer* yang mengandung 1% 2-mercaptoethanol untuk setiap prosedur purifikasi. Setelah itu, dilakukan proses perhitungan jumlah *lysis buffer* yang akan digunakan untuk lima sampel larva dari masing-masing vial perlakuan. Campuran *lysis buffer* ditambahkan pada setiap sampel larva pada *treff tube*. Larva yang ada pada *treff tube* kemudian dihancurkan menggunakan *micropestle* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14,000 *rpm* selama 2 menit. Lisat yang diperoleh kemudian dimasukkan pada *treff tube* (RNAase-free tube) baru. Tambahkan 300 μ L etanol pada *treff tube* lalu dihomogenisasi menggunakan vorteks 10 detik untuk presipitat yang terlihat setelah penambahan etanol. Pindahkan 700 μ L pada *spin cartridge* dan disentrifuge pada kecepatan 14,000 *rpm* pada suhu ruang. Tambahkan 700 μ L *wash buffer I* pada *spin*



cartridge lalu disentrifuge kembali dengan kecepatan 14,000 rpm selama 15 detik. Lalu, dilakukan sentrifugasi pada *spin cartridge* dengan kecepatan 14,000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Setelah itu, 40 μ L RNAase-Free Water ditambahkan pada bagian tengah *spin cartridge* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14,000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang. Lalu ditambahkan lagi 40 μ L RNAase-Free Water pada bagian tengah *spin cartridge* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 14,000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang. Setelah itu, untuk penyimpanan, RNA yang telah diisolasi disimpan pada suhu -80°C.

Proses pengukuran ekspresi gen dilakukan menggunakan *real-time* PCR GoTaq®1-Step RT q-PCR System (Promega®). Reaksi RT-PCR dilakukan dalam tube qPCR dengan volume 10 μ L. *Rotor-Gene Q thermal cycler* (Qiagen®) dioperasikan dengan profil: 37°C selama 15 menit, 95°C selama 10 menit, dan 40 kali pengulangan siklus PCR dimana satu siklus terdiri dari 95°C selama 10 detik dan 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Setelah itu, diikuti oleh *melt curve analysis* dari 60°C hingga 95°C (Rosa *et al.*, 2021).

Tabel 2. Sekuens primer masing-masing gen

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward	Reverse	
<i>dpt</i>	5' – GTT CAC CAT TGC CGT CGC CTT AC – 3'	5' – CCT CCT ATA CCT GTC GTG AAC CC – 3'	1. PCR cycle: 40 Siklus 2. Reverse transcription: 37°C, 15 menit 3. Hot start: 95°C, 10 menit 4. Denaturasi: 95°C, 10 detik 5. Annealing: 60°C, 30 detik 6. Extension: 72°C, 10 detik
<i>drs</i>	5' – TTG TTC GCC CTC TTC GCT GCT CT – 3'	5' – GCA TCC TTC GCA CCA GCA CTT AC – 3'	
<i>rp49</i>	5' – GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG – 3'	5' – AAA CGC GGT TCT GCA TGA G – 3'	

2.2.9 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan diolah menggunakan *software Graphpad Prism10*. Hasil data yang didapatkan akan dipresentasikan dalam nilai rata-rata (*mean*) $\pm$ standar deviasi (SD) dan nilai p (<0,05) dianggap signifikan secara statistik.

