

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Hiperglikemia merupakan kondisi dimana tubuh mengalami peningkatan kadar glukosa darah yang melebihi batas normal dan merupakan salah satu tanda khas penyakit diabetes melitus (DM). Diabetes merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat dari kelainan sekresi insulin, aktivitas insulin, ataupun keduanya (Junita dan Syahrizal, 2021). Berdasarkan data *International Diabetes Federation* (IDF), menyatakan bahwa terdapat 537 juta jiwa dengan umur 20-79 tahun yang mengalami diabetes (IDF, 2021). Di Indonesia sendiri berada di urutan kelima dengan kasus diabetes mencapai angka 19,5 juta dan kemungkinan besar akan meningkat hingga 28,6 juta kasus pada tahun 2045 (IDF, 2021). Jumlah kasus tersebut dapat lebih membahayakan masyarakat dengan adanya komplikasi diabetes yang meningkatkan angka disabilitas sebanyak 22% dalam 10 tahun terakhir. Salah satu komplikasi yang umum yang terjadi pada penderita diabetes salah satunya yaitu *Diabetic Sensory Neuropathy*, terdapat lebih dari 40 juta penderita diabetes terkena komplikasi neuropati secara global. Dari komplikasi tersebut menyebabkan banyaknya kasus amputasi ekstremitas distal hingga 40-60% tiap kasusnya yang disebabkan hilangnya respon sensorik (Baxi dkk., 2020).

Dalam penelitian, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) sering digunakan sebagai model untuk mempelajari respon nosiseptik terkait hiperglikemia, hal ini dikarenakan pada *D. melanogaster* memiliki IPCs (*Insulin producing cell*) yang fungsinya sama dengan pankreas pada manusia yang berfungsi untuk mengatur gula darah seperti insulin dan glukagon. IPCs memproduksi molekul *Drosophila insulin-like peptides* (DILP) yang memiliki mekanisme kerja sama dengan insulin yang terdapat pada manusia, sehingga dengan diberikannya pakan diet tinggi gula akan merusak sel-sel DILP yang akan menyebabkan peningkatan glukosa pada *D. melanogaster* (Nainu, F., 2018; Baenas, N dan Anika, 2022). *D. melanogaster* memiliki kemampuan untuk menghindari stimulus, sebagai sebuah ancaman yang diregulasi dengan saraf stimulus spesifik (nosiseptif). Salah satu jenis stimulus yang mempengaruhi terhadap fisiologis makhluk hidup yaitu suhu yang dikenal dengan *thermosensation*. Pada mamalia, *thermosensation* diatur oleh *Transient Receptor Potential* (TRP). Saluran TRP dapat diaktivasi dengan melalui rangsangan suhu, mekanik, dan juga kimia. Pada *D. melanogaster* terdapat gen yang merespon suhu dingin yaitu *brv3*, yang dapat mendeteksi suhu 10°C, gen *brv3* berfungsi sebagai



Optimized using
trial version
www.balesio.com

ibat dalam mendeteksi suhu lingkungan yang sangat penting aksis, yaitu kemampuan untuk bergerak menuju atau menjauhi suhu dingin (Chiang dkk., 2023; Imambocus dkk., 2022). *D. melanogaster* memiliki siklus hidup yang dipengaruhi oleh suhu, dengan suhu optimal yaitu 25-28°C (Suharsono dan Nuryadin, 2019). Pada penelitian oleh Suzuki dkk (2020) telah melakukan eksperimen tentang kemampuan menghindar terhadap suhu dingin pada *D. melanogaster* model

diabetes, akan tetapi eksperimen terkait ekspresi gen *brv3* belum dilakukan. Selain itu penting juga analisis ekspresi gen *srl*, gen ini berkaitan dengan pengujian diabetes melitus yang berhubungan dengan metabolisme *D. melanogaster*. Gen *srl* berperan utama dalam penggunaan oksigen di mitokondria sehingga mengatur produksi ATP dan protein pada matriks mitokondria dalam jalur insulin-TOR (Mukherjee dan Atanu, 2013). Gen *srl* memiliki homolog dengan ekspresi gen *peroxisome proliferator-activating receptor gamma coactivator-1 α* (PGC-1 α) yang merupakan koaktivator utama pada mamalia yang berperan dalam homeostatik energi, glukoneogenesis, oksidasi asam lemak, dan pengaturan toleransi termal.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh suhu dingin terhadap ekspresi gen *brv3* dan *srl* pada model hiperglikemia *D. melanogaster*?

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui pengaruh suhu dingin terhadap ekspresi gen *brv3* dan *srl* pada model hiperglikemia *D. melanogaster*.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

II.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas kimia (Pyrex[®]), (Biologix[®]), micropestle (Geneaid[®]), timbangan analitik (Ohaus[®]), *sentrifuge*, GoTaq[®] 1-Step RT-qPCR System (Promega), termometer, vial dan plugs *D. melanogaster* (Biologix[®])

II.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu agar (*Swallow*[®]), aluminium foil, asam propionat, *aquadest*, brewer's yeast, *D. melanogaster* (*W*¹¹¹⁸), etanol 70% (Onemed[®]), larutan NaCl 0,9% (Otsuka[®]), metil paraben, metformin, PureLink[™] RNA Mini Kit (Invitrogen[™]), primer *brv3*, primer *srl*, primer *rp49*, sukrosa, *treff tube* (Treff lab[®]), tepung jagung.

II.2 Metode Penelitian

II.2.1 Penyiapan Hewan Coba *D. Melanogaster*

Pada eksperimen ini digunakan model uji berupa lalat buah *D. melanogaster w*¹¹¹⁸. Stok *D. melanogaster* dipelihara dalam vial berisi pakan standar pada suhu 25°C dan kelembaban relatif 60% kemudian 10 lalat jantan dan juga 10 lalat betina dikawinkan di masing-masing perlakuan yaitu kontrol tanpa perlakuan yang berisikan pakan normal, pakan Diet Tinggi Gula (DTG) dengan konsentrasi 30% sukrosa, dan pakan yang berisikan Diet Tinggi Gula (DTG) konsentrasi 30% sukrosa dan metformin dengan konsentrasi 25 mM.

II.2.2 Pembuatan Pakan Normal, Diet Tinggi Gula, dan Metformin

Pembuatan pakan larva *D. Melanogaster* dibuat menjadi lima bagian komposisi pakan pada kelima kelompok tertera pada Tabel 1. Masing-masing kelompok terdapat 10-15 larva (Musselman dkk., 2011; Catalani dkk., 2021).

Tabel 1. Komposisi pakan *D. melanogaster*

Komposisi	Kontrol Tanpa Perlakuan	Kontrol negatif	DTG+MET
Tepung jagung	7,5 g	7,5 g	7,5 g
Yeast	2,5 g	2,5 g	2,5 g
	0,9 g	0,9 g	0,9 g
	4,5 g	30 g	30 g
	-	-	25 mM
	400 µL	400 µL	400 µL
	450 µL	450 µL	450 µL
	ad 100 mL	ad 100 mL	ad 100 mL



Pembuatan pakan normal dibuat dengan menimbang semua bahan yang tertera pada tabel kecuali asam propionat, metil paraben, dan metformin, setelah bahan ditimbang, campurkan semua bahan dalam 100 mL di gelas beaker, lalu panaskan hingga mendidih, setelah dipanaskan cuplik asam propionat dan metil paraben lalu homogenkan, setelah itu masukkan ke dalam vial masing-masing 5 mL. Pada pembuatan pakan Diet Tinggi Gula (DTG) 30% kurang lebih sama yang membedakan pada konsentrasi sukrosa yang digunakan, sedangkan pada pakan Diet Tinggi Gula (DTG) + metformin, dibuat dalam 500 mM dengan menimbang 0,414 gram dan dilarutkan dalam 10 mL *water one*[™], kemudian dicuplik 0,25 mL untuk 25 mM dan nantinya akan dicampurkan tiap vial yang berisikan 5 mL pakan DTG.

II.2.3 Uji Cold Sensitivity

Pengujian ini dilakukan dengan menyiapkan plat agar 2%, yang dibuat dengan melarutkan 2 gram serbuk agar dalam 100 mL air. Kemudian dihomogenkan lalu dipanaskan pada waterbath hingga campuran menjadi bening. Setelah itu, tuang campuran ke dalam cawan petri sebanyak \pm 20 mL, diamkan hingga memadat dan dinginkan air pada wadah *cooler box* hingga suhu 10°C, setelah memadat, letakkan 10-15 larva instar III yang telah dicuci dengan NaCl 0,9% diatas agar, kemudian letakkan pada wadah *cooler box* untuk mengamati pergerakan larva selama 5 menit pada suhu dingin (Barik, 2018).

II.2.4. Uji Crawling cold sensitivity

Pengujian *Crawling* dilakukan dengan membuat plat agar 2% kemudian masing-masing perlakuan diambil larva instar III lalu amati pergerakan larva di dalam cawan petri dan hitung jarak tempuh larva selama 1 menit melalui kertas grafik dalam satuan cm/menit (Sabat dkk., 2016; Meghashree dan Nagaraj, 2020).

II.2.5 Penyiapan Sampel RNA

Proses isolasi RNA dilakukan menggunakan RNAqueous[™] Total RNA *Isolation Kit* (Invitrogen®). Sebanyak sepuluh larva *D. melanogaster* dimasukkan ke dalam *treff tube*. Reagen *lysis buffer* segar disiapkan dengan mencampurkan 2-mercaptoethanol, di mana 1% dari total volume *lysis buffer* ditambahkan untuk setiap 300 μ L *lysis buffer* per sampel. Campuran ini kemudian ditambahkan ke masing-masing *tube* yang berisi larva, kemudian larva dihancurkan menggunakan *micropestle*. Sampel kemudian disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Lisat yang dihasilkan dipindahkan ke *tube* baru, lalu tambahkan 300 μ L etanol 70% kemudian vortex selama 10 detik. Sampel kemudian dipindahkan ke *spin tube* dan disentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm. Proses ini setelah itu, filtrat dibuang, dan *spin cartridge* dikembalikan ke *spin tube* baru. Selanjutnya, tambahkan 700 μ L *Wash Buffer I* ke *spin tube* dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang, dan *spin cartridge* dipindahkan ke *collection tube* yang baru. Kemudian tambahkan etanol 96% sebanyak 500 μ L dan disentrifugasi pada



kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang. Langkah ini juga diulangi dua kali (Ambion, 2012).

Setelah proses diulangi dua kali, *spin cartridge* disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Kemudian, tambahkan sebanyak 40 μ L *RNAse-free water* ke bagian tengah *spin cartridge*. Langkah ini diulang kembali dengan menambahkan 40 μ L *RNAse-free water*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Setelah itu, tambahkan 40 μ L *RNAse-free water* ke dalam *spin cartridge* dan sampel disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Setelah selesai, *spin cartridge* dibuang dan *collection tube* yang berisi RNA disimpan pada suhu -80°C (Ambion, 2012).

II.2.6 Analisis Ekspresi Gen

Pengukuran ekspresi gen *brv3* dan *srl* dilakukan dengan menggunakan GoTaq[®] 1-Step RT-qPCR System (Promega). Proses *realtime* PCR dilakukan dengan dua set primer.

Tabel 2. Sekuens primer masing-masing gen

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward	Reverse	
<i>brv3</i>	5'- TAC AGC GTA AAG TCG TCG ATGAA- 3'	5' – AGA TGG GCT TTG AGT TCCTC- 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>srl</i>	5'- CTC TTG GAG TCC GAG ATC CGC AA-3'	5'- GGG ACC GCG AGC TGA TGGTT – 3'	
<i>rp49</i>	5'- GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG – 3'	5' – AAA CGC GGT TCT GCA TGA G – 3'	

II.2.7 Analisis data

Data hasil percobaan dianalisis menggunakan pendekatan statistik dengan bantuan *GraphPad Prism 9* menggunakan pendekatan *one-way ANOVA* dan dilanjutkan pengujian *Dunnett's multiple comparisons test* dan *t test* untuk dibahas dan ditarik kesimpulan.



Optimized using
trial version
www.balesio.com