

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hiperglikemia secara global telah meningkat secara signifikan dan diperkirakan akan terus meningkat hingga tahun 2050 (Mouri & Badireddy, 2023; Ong et al., 2023). Hiperglikemia yang persisten merupakan ciri dari diabetes melitus (DM), suatu gangguan metabolik kronis yang disebabkan oleh gangguan produksi insulin, penurunan sensitivitas sel terhadap insulin, atau kombinasi dari kedua faktor tersebut (Goyal et al., 2023). Pada tahun 2021, prevalensi diabetes secara global pada kelompok usia 20–79 tahun mencapai 10,5% (536,6 juta orang) dan diperkirakan meningkat menjadi 12,2% (783,2 juta orang) pada tahun 2045 (Sun et al., 2022). Di Indonesia, angka prevalensi diabetes meningkat dari 9,19% pada tahun 2020 (18,69 juta kasus) menjadi 16,09% (40,7 juta kasus) pada tahun 2045 (Wahidin et al., 2024).

Hiperglikemia kronis pada DM sering disertai gangguan metabolik lainnya yang dapat menyebabkan kerusakan organ dan komplikasi (Goyal et al., 2023). Strategi pengelolaan diabetes mencakup modifikasi gaya hidup, penyesuaian pola makan, pengobatan antidiabetes oral, dan terapi insulin dalam kasus yang parah (Ojo et al., 2023). Pengobatan hiperglikemia dengan pemberian insulin atau obat diabetes lain yang bertujuan untuk menurunkan kadar gula darah tinggi. Jika seseorang dengan diabetes mengonsumsi terlalu banyak insulin dibandingkan dengan asupan makanan atau tingkat aktivitas fisiknya, gula darahnya dapat turun terlalu rendah, sehingga mengakibatkan hipoglikemia (Arora et al., 2022). Selain itu, efek samping lainnya dan biaya pengobatan yang tinggi menghambat manajemen diabetes yang berkelanjutan (Ojo et al., 2023). Sebagai alternatif, obat berbasis tanaman menjadi pilihan karena harganya yang terjangkau, aksesibilitasnya, dan risiko efek samping yang lebih rendah. Salah satu fitokimia yang menjanjikan dengan potensi antidiabetes adalah quercetin (Ansari et al., 2022).

Quercetin (*3,5,7-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one*) adalah flavonoid alami yang banyak ditemukan dalam berbagai sayuran, seperti bawang merah, apel, beri, kacang-kacangan, kulit kayu, bunga, dan teh (Shi et al., 2019). Studi menunjukkan bahwa quercetin memiliki berbagai manfaat, termasuk sifat kardioprotektif, antiinflamasi, antikanker, dan antioksidan (Martinez et al., 2024; Shi et al., 2019; Yang et al., 2020). Mekanisme quercetin dikaitkan dengan mekanisme seperti



meningkatkan sensitivitas insulin, metabolisme glukosa, dan sekresi insulin (Shi et al., 2019) (Ansari et al., 2022). Selain itu, quercetin menghambat enzim *dipeptidil peptidase-4* (DPP-4), sehingga memperpanjang aktivitas hormon *glukagon-like peptide-1* (GLP-1) dan *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) (Ansari et al., 2022). Aktivitas farmakologis ini menunjukkan potensi quercetin sebagai kandidat untuk pengembangan obat antidiabetik. Namun, untuk memastikan keamanan dan efektivitasnya, studi farmakokinetik dan farmakodinamik diperlukan menggunakan model hewan (Negi et al., 2023). Sejalan dengan pertimbangan kode etik dan prinsip pengurangan penggunaan mamalia sebagai model penyakit, model hewan alternatif semakin banyak dieksplorasi (Nainu et al., 2022).

*Drosophila melanogaster* telah muncul sebagai model alternatif yang ideal untuk skrining obat dan penelitian karena ukurannya yang kecil, kemampuannya berkembang biak dalam jumlah besar, serta siklus hidupnya yang pendek, memungkinkan pengumpulan data yang cepat dan eksperimen yang hemat biaya (Rulifson et al., 2002). Dalam beberapa penelitian, model diabetes pada *D. melanogaster* telah dikembangkan untuk mempelajari mekanisme molekuler penyakit ini dan menguji agen terapi yang berpotensi (Rulifson et al., 2002). Sebagai contoh, model hiperglikemia dapat dibuat pada larva dengan memberi Diet Tinggi Gula (DTG), yang meniru beberapa aspek utama diabetes, seperti tingginya kadar glukosa darah dan gangguan metabolik (Miao et al., 2022). Pada *Drosophila*, sel penghasil insulin (*insulin-producing cells* atau IPCs) memiliki kesamaan fungsional dengan sel  $\beta$  pankreas pada manusia (Miao et al., 2022), menjadikan lalat buah ini model yang relevan untuk mempelajari regulasi glukosa dan pengembangan terapi.

Meskipun sudah ada beberapa penelitian mengenai quercetin, studi yang secara khusus menggunakan model diabetes pada *Drosophila melanogaster* untuk mengevaluasi efek antihiperglikemik senyawa ini masih terbatas. Penelitian sebelumnya sebagian besar menggunakan lalat sebagai model untuk memahami mekanisme molekuler, dengan menganalisis ekspresi gen yang berperan dalam metabolisme energi seperti *dilp*, *thor*, *srl*, dan gen terkait lainnya. Namun, studi tersebut belum secara komprehensif mengevaluasi mekanisme antihiperglikemik quercetin. Oleh karena itu, dilakukan studi efek hipoglikemik quercetin pada *D. melanogaster* dengan



a hiperglikemik yang diinduksi dengan DTG dan lalat diinduksi. Penelitian ini mengevaluasi fenotip dan ekspresi dalam metabolisme energi, kemudian dilanjutkan dengan *lar docking*. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan insight tentang efek quercetin sekaligus membangun dasar

untuk skrining senyawa hipoglikemik menggunakan *D. melanogaster* sebagai model organisme.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana efek quercetin secara *in vivo* terhadap fenotip *Drosophila melanogaster*?
2. Bagaimana validasi secara *in silico* melalui pendekatan *molecular docking* dapat menjelaskan potensi interaksi quercetin dengan target enzim yang berperan dalam mekanisme antidiabetes?

## 1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Penelitian

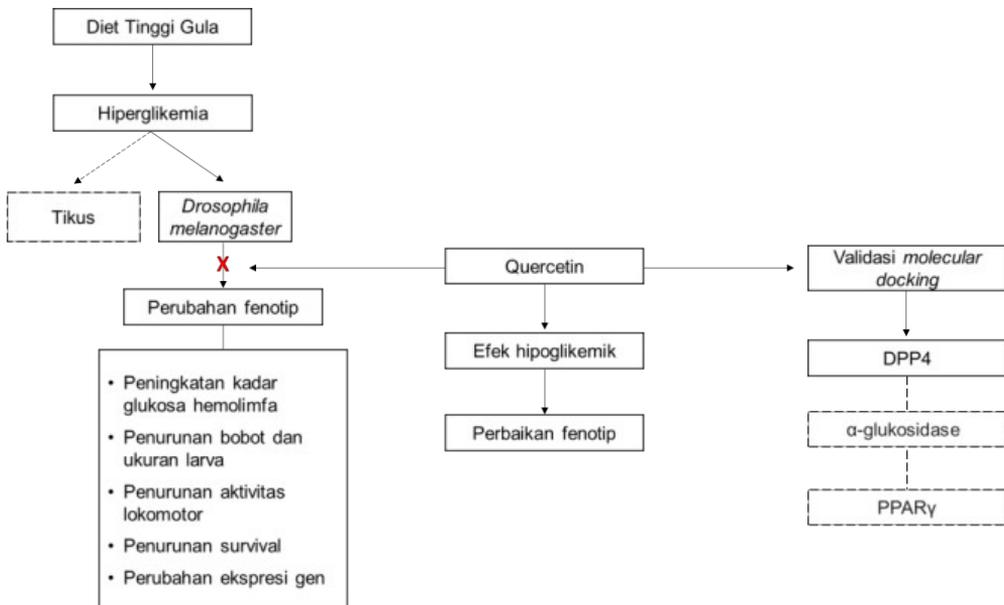
1. Menganalisis efek quercetin secara *in vivo* terhadap fenotip *Drosophila melanogaster*.
2. Melakukan validasi secara *in silico* melalui pendekatan *molecular docking* untuk menjelaskan potensi interaksi quercetin dengan target enzim yang berperan dalam mekanisme antidiabetes.

### 1.3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memperluas pemahaman tentang mekanisme molekuler quercetin sebagai senyawa antidiabetes, khususnya melalui analisis pengaruhnya secara *in vivo* terhadap fenotip *Drosophila melanogaster*. Selain itu, validasi *in silico* melalui pendekatan *molecular docking* yang dilakukan dapat memberikan informasi mendalam mengenai potensi interaksi quercetin dengan target enzim, sehingga mendukung pengembangan terapi diabetes berbasis mekanisme yang spesifik.



## 1.4 Kerangka Teori



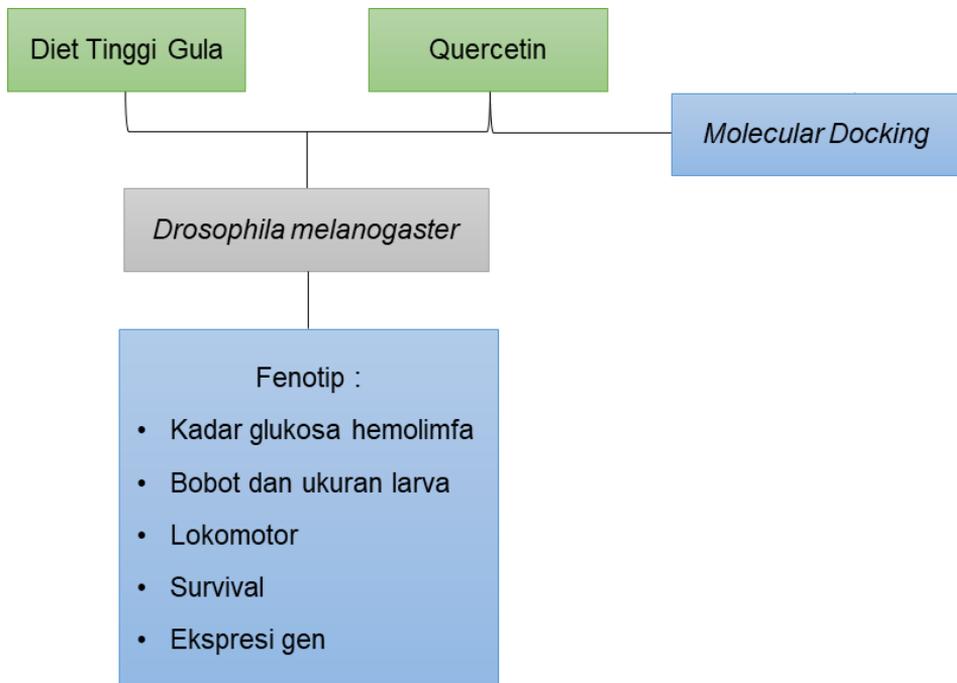
Keterangan:

- Dilakukan pada penelitian  
 - - - - - Tidak dilakukan pada penelitian

**Gambar 1.** Kerangka Teori Penelitian



## 1.5 Kerangka Konsep



Keterangan:

Variabel bebas

Variabel Antara

Variabel terikat

**Gambar 2.** Kerangka Konsep Penelitian



## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengevaluasi efek hipoglikemik quercetin pada model *Drosophila melanogaster* melalui pendekatan fenotip, ekspresi gen, dan *molecular docking*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi-Toksikologi, Laboratorium Biofarmasi Fakultas Farmasi dan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar.

### 2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (Iwaki®), timbangan analitik (Sartorius®), *Zoom stereo mikroskop* (Motic®), Papan CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> stage), BSC II (*Biosafety Cabinet Class II*), *Thermal cycler qPCR* (RotorGene Q, Qiagen®), *Micropestle* (Geneaid®), *Vial Drosophila* (Biologix®), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), Lemari pendingin, Mikropipet (*Dragonlab*), *Microtube (Gene follower)*, Pinset (*Taiyo electric*) dan kompor listrik (IKA C-MAG HS®).

Bahan yang digunakan adalah Agar (Swallow® , PT. Dunia Bintang Walet, No:318509040409, Indonesia), sukrosa (J.T.Baker, Avantor, Performance Material, No: 6321-05, USA), *Yeast* (Brewer's yeast, Health Paradise Sdn, No.199701038799.454299-W, Malaysia), *Corn meal* (Ellken Healthy Food, Nawasagena Pangan Kreatif, No. 5053571020029-26, Indonesia), Asam propionat (Merck, Merck KGaA, No. 79-09-4, Germany), alkohol 70%, Metil paraben (Techno Pharmchem, No. 223650, India), Aqua®, *D. melanogaster Wildtype (w<sup>1118</sup>)*, quercetin (CAS RN: 117-39-5, *Product Number: Q0112, Tokyo Chemical Industry (TCI), America*).

### 2.3 Metode Kerja

#### 2.3.1 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Drosophila melanogaster (w<sup>1118</sup>)* diperoleh dari *Laboratory Host Defense and Responses (Kanazawa University)*, yang dikembangbiakkan dan ditempatkan dalam vial (pakan) pada suhu 25 °C.



#### Preparasi Larutan Quercetin

Larutan quercetin dibuat menggunakan etanol 70% sebagai pelarut. Dibuat larutan quercetin konsentrasi 10 mM dengan cara melarutkan 0.015 g

quercetin dalam 5 mL etanol 70%. Kemudian dibuat serial pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , dan 0.25  $\mu\text{M}$ .

### 2.3.3 Pembuatan Pakan *D. melanogaster*

Pakan Diet Tinggi Gula (DTG) untuk Larva *D. melanogaster* disiapkan dengan mencampur jagung, ragi, agar dan sukrosa 30% kemudian campuran diaduk hingga kental, lalu ditambahkan asam propionat dan metil paraben menjadi campuran, kemudian ditambahkan larutan quercetin dengan masing – masing konsentrasi (0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , dan 10  $\mu\text{M}$ ). Sementara pakan untuk *D. melanogaster* dewasa menggunakan pakan standar yang ditambahkan larutan quercetin dengan konsentrasi (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , dan 10  $\mu\text{M}$ ). Campuran pakan yang dihasilkan dituang ke dalam vial. Pakan kemudian disimpan untuk penelitian lebih lanjut.

**Tabel 1.** Komposisi pakan *D. melanogaster* (Baenas & Wagner, 2022)

| Komposisi         | Standar           | Diet Tinggi Gula (DTG) |
|-------------------|-------------------|------------------------|
| Tepung jagung     | 7,5 g             | 7,5 g                  |
| Yeast             | 2,5 g             | 2,5 g                  |
| Agar              | 0,9 g             | 0,9 g                  |
| Sukrosa           | 4,5 g             | 30 g                   |
| Asam propionat    | 400 $\mu\text{L}$ | 400 $\mu\text{L}$      |
| Metil paraben 15% | 450 $\mu\text{L}$ | 450 $\mu\text{L}$      |
| Aqua              | Ad 100 mL         | Ad 100 mL              |

### 2.3.4 Pengukuran Kadar Glukosa Hemolimfa Larva

Sebanyak 30 lalat yang terdiri atas lalat jantan 12 ekor dan lalat betina 18 ekor di masukkan di setiap vial yang berisi pakan perlakuan. Lalat dibiarkan kawin selama 5-7 hari hingga menghasilkan larva. Setelah hari ke-10, sebanyak 100 larva instar tiga dikumpulkan dan dicuci dengan NaCl 0,9% untuk membuang sisa pakan. Kemudian, larva dikeringkan di atas tisu. Larva dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube*, lalu dihancurkan dengan menggunakan *micropestle*. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 16.000 rpm, kemudian supernatan dipipet sebanyak 10  $\mu\text{L}$  lalu ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  reagen glukosa GOD-PAP (*Glucose Oxidase – Peroxidase Aminoantipirin*) dan ditunggu hingga 10 menit. Lalu dilakukan



metri UV – Vis pada panjang gelombang 500 nm (Lourido glukosa dalam hemolimfa dihitung menggunakan rumus

$$\frac{\text{absorbansi Sampel}}{\text{absorbansi Standar}} \times K. \text{Standar mg/dL (1)}$$

### 2.3.5 Pengukuran Bobot Badan Larva

Larva instar tiga dikumpulkan dan dicuci dengan NaCl 0,9% untuk membuang sisa pakan. Setelah itu larva dikeringkan menggunakan tisu, larva dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube* yang telah ditimbang sebelumnya. Larva ditimbang satu per satu menggunakan timbangan analitik untuk memperoleh berat rata-rata. Dilakukan tiga kali pengulangan (Baenas & Wagner, 2022).

### 2.3.6 Pengukuran Panjang dan Lebar Badan Larva

Larva instar tiga dikumpulkan dan dicuci dengan NaCl 0,9% untuk menghilangkan sisa pakan. Setelah dicuci, larva dikeringkan menggunakan tisu, kemudian panjang dan lebarnya diukur satu per satu menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan menggunakan tiga larva dengan tiga kali pengulangan.

### 2.3.7 *Crawling assay*

Penelitian ini menggunakan tiga larva instar tiga untuk mengamati *crawling*. Larva ditempatkan pada cawan petri berisi agar yang diletakkan di atas kertas grafik, kemudian dibiarkan merangkak selama 1 menit (Nayak & Mishra, 2021; Post & Paululat, 2018).

### 2.3.8 Pengukuran Glukosa Hemolimfa Lalat Dewasa

Pengukuran kadar glukosa dalam hemolimfa dilakukan menggunakan lalat berumur tiga hari yang diberi pakan standar atau pakan yang mengandung obat. Sebanyak tiga replika biologis disiapkan untuk masing-masing kelompok kontrol dan eksperimen. Setiap replika terdiri atas 10 mg lalat jantan yang dihancurkan dan dihomogenkan dalam 100  $\mu$ L buffer PBS. Homogenat tersebut kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 16.000 rpm. Supernatan yang dihasilkan dikumpulkan, dan sebanyak 10  $\mu$ L dicampurkan dengan 1000  $\mu$ L reagen glukosa GOD-PAP dalam tabung *microcentrifuge tube*. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500 nm (Lagunas-Rangel et al., 2023). Kadar glukosa dalam hemolimfa dihitung menggunakan rumus berikut (2):



$$\frac{\text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Standar}} \times K. \text{ Standar mg/dL (2)}$$

### 2.3.9 Analisis *Negative Geotaxis*

Pengujian kemampuan lokomotor setiap kelompok perlakuan dilakukan menggunakan analisis *negative geotaxis* pada *D. melanogaster* di dalam vial yang telah diberi penanda. Lalat dipindahkan ke vial yang sebelumnya disterilkan dengan alkohol 70% dan dibiarkan beradaptasi selama 1 menit sebelum pengujian dimulai. Vial kemudian diketuk perlahan di atas meja, waktu diatur selama 15 detik, dan lalat dibiarkan memanjat ke atas. Jumlah lalat yang berhasil melewati tanda batas sepanjang 8 cm dicatat untuk setiap pengujian (Rogers et al., 2020).

### 2.3.10 Uji Kelangsungan Hidup

Kelangsungan hidup lalat *w<sup>1118</sup>* diamati sejak hari pertama perlakuan dengan quercetin. Selama periode pengamatan, pakan diganti setiap tiga hari, dan jumlah lalat yang mati dalam setiap vial dicatat setiap hari (Baenas & Wagner, 2022).

### 2.3.11 Penyiapan Sampel RNA

Isolasi RNA menggunakan *RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit* (Invitrogen™). Sebanyak 10 larva instar tiga *D. melanogaster* yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube*. *Reagen lysis buffer* disiapkan kemudian dicampur dengan 2-mercaptoethanol diambil setiap 300 µL *lysis buffer* untuk setiap sampel dan ditambahkan *2-mercaptoethanol* sebanyak 1% dari total volume *lysis buffer*. Setelah itu, ditambahkan sebanyak 300 µL campuran tersebut ke dalam masing-masing tube sampel dan sampel lalat dihancurkan dengan menggunakan *micropestle*. Kemudian, disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Lisat ditransfer ke tube baru kemudian ditambahkan 300 µL etanol 70% dan divortex selama 10 detik.

Selanjutnya, sampel ditransfer ke spin cartridge dan disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 14.000 rpm, proses diulangi sebanyak 2 kali. Setelah itu, filtrat dibuang dan dimasukkan kembali *spin cartridge* pada tube yang sama. Sebanyak 700 µL *Wash Buffer I* ditambahkan kedalam *spin cartridge* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang. Filtrat dibuang dan *spin cartridge* dipindahkan pada . Sebanyak 500 µL *Wash Buffer II* ditambahkan pada *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm. Proses tersebut diulangi sebanyak 2 kali. Selanjutnya, *spin cartridge* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan 40 µL *RNAse free water* ke dalam *spin cartridge* dan diulangi dengan menambahkan



kembali *RNAse free water* dalam jumlah yang sama. Setelah itu diinkubasi pada temperatur ruang selama 1 menit. Kemudian ditambahkan kembali 40  $\mu$ L *RNAse free water* ke dalam *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. *Spin cartridge* dibuang dan *collection tube* yang mengandung RNA disimpan pada suhu - 80°C.

### 2.3.12 Analisis Ekspresi Gen

Pengukuran level ekspresi gen dilakukan dengan metode *real-time reverse transcription PCR* (RT-PCR) menggunakan kit *Universal One-Step RT-qPCR Kit* (Luna®) yang dijalankan berdasarkan protokol dari pabrik pembuatnya. *Real-time PCR* dijalankan menggunakan satu set primer gen *dilp2*, *thor*, dan *srl* di dalam tube PCR dengan volume 10  $\mu$ L. Sebagai referensi tingkat ekspresi gen inang, digunakan satu pasang primer protein ribosomal *rp49* yang dijalankan sesuai prosedur RT-qPCR. Satu siklus terdiri dari 95°C selama 15 detik dan 60°C selama 30 detik. Setelah 40 siklus, maka dilakukan *melt curve analysis* dari suhu 40°C selama 1 menit.

**Tabel 2.** Sekuens primer gen

| Gen          | Forward                                 | Reverse                             |
|--------------|---|-------------------------------------|
| <i>dilp2</i> | TCTGCAGTGAAGCTCAACGA                    | CAACTGCAGGGGATTGAGG                 |
| <i>srl</i>   | 5'-CTC TTG GAG TCC GAG ATC<br>CGC AA-3' | 5'-GGG ACC GCG AGC TGA<br>TGG TT-3' |
| <i>thor</i>  | AAG CAG ACC AAG TCG CTG AA              | ATT TGG CAG TTG CTG CAT<br>GG       |
| <i>rp49</i>  | 5'-<br>GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG-<br>3'   | 5'-<br>AAACGCGGTTCTGCATGAG-3        |

### 2.3.13 Molecular docking

Kumpulan struktur ligan diperoleh dari basis data PubChem dari *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). Daftar ligan yang digunakan adalah quercetin (CID: 5280343), dan vildagliptin (CID: 6918537). Kemudian data CID yang diperoleh dikonversi ke format *Protein Data Bank* (PDB) dengan menggunakan aplikasi UCSF-Chimera. Struktur kristal DPP4 (PDB ID: 2PRS) diambil dari PDB. *Molecular docking* dilakukan



UCSF-Chimera yang terintegrasi dengan AutoDock Vina 1.16. Langkah pertama adalah menyiapkan struktur ligan dan protein menggunakan *AutoDock Tools*. Selanjutnya, tahap *docking* dilakukan dengan menetapkan jalur direktori penyimpanan file melalui menu AutoDock. Hasil *docking* kemudian dianalisis menggunakan aplikasi *AutoDock Vina* 1.16 (Butt et al., 2020; Zabidi et al., 2021).

### 2.3.14 Analisis Data

Semua data dianalisis menggunakan perangkat lunak *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 9 (GraphPad software), dengan minimal tiga replikasi biologis independen. Sebagian besar hasil disajikan dalam bentuk grafik batang, dan dilakukan analisis varians satu arah (ANOVA) yang dilanjutkan dengan analisis Tukey untuk evaluasi statistik. Data disajikan sebagai nilai rata-rata  $\pm$  deviasi standar (SD), dengan tingkat signifikansi statistik ditetapkan pada nilai  $p < 0,05$

