

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperglikemia merupakan kondisi kadar glukosa dalam darah meningkat secara abnormal dan menjadi indikator utama disregulasi metabolik yang sering dikaitkan dengan diabetes melitus. Menurut data *International Diabetes Federation* (IDF) pada tahun 2021, prevalensi hiperglikemia pada orang dewasa terus meningkat, sekitar 537 juta orang berusia 20-79 tahun hidup dengan diabetes (Sun et al., 2022). Jumlah ini diproyeksikan meningkat menjadi 643 juta pada tahun 2030 (Sun et al., 2022), dan sekitar 1,31 miliar pada tahun 2050 (Ong et al., 2023). Tren peningkatan ini menegaskan perlunya pengembangan strategi pengelolaan yang lebih efektif untuk mengurangi komplikasi yang terkait dengan hiperglikemia kronis. Hiperglikemia secara signifikan berkontribusi terhadap timbulnya berbagai komplikasi yang terkait dengan diabetes melitus, termasuk penyakit kardiovaskular, neuropati, nefropati, retinopati dan ketoasidosis diabetik, yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian (Ansari et al., 2022; ElHajj Chehadeh et al., 2022). Oleh karena itu, pengelolaan kadar glukosa darah sangat penting untuk mengurangi risiko komplikasi tersebut. Beberapa target molekuler telah diidentifikasi dalam pengelolaan diabetes melitus tipe 2, termasuk α -glukosidase, *dipeptidyl peptidase-IV* (DPP-IV), *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ), dan *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B) (Trang Nguyen & Le, 2012; Tshiyoyo et al., 2022).

Saat ini, telah banyak obat konvensional tersedia untuk mengobati diabetes melitus, termasuk inhibitor α -glukosidase, seperti akarbose dan miglitol, yang berfungsi memperlambat atau mengurangi penyerapan glukosa di saluran pencernaan, sehingga secara efektif menurunkan kadar glukosa darah postprandial (Hossain et al., 2020; Trang Nguyen & Le, 2012). Demikian pula, inhibitor DPP-IV memainkan peran penting dalam homeostasis glukosa dengan meningkatkan sekresi insulin sekaligus menghambat pelepasan glukagon (Deacon, 2020). Agonis PPAR γ bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin dan memfasilitasi pengambilan glukosa pada otot rangka dan jaringan adiposa (Dhankhar et al., 2023).



umbatan aktivitas PTP1B telah terbukti meningkatkan dan mendorong pengambilan glukosa, terutama di otot, sehingga menjadikannya strategi yang menjanjikan diabetes melitus tipe 2 (Liu et al., 2023). Namun, a panjang obat-obatan ini dapat menyebabkan efek diinginkan seperti infeksi saluran kemih, asidosis laktat,

gagal jantung, dan osteoporosis, serta biaya pengobatan yang cukup mahal (D'Souza et al., 2022). Oleh karena itu, pengujian aktivitas anti-hiperglikemia dari senyawa baru diperlukan untuk mencapai tujuan terapi yang efektif dan efisien.

Dalam penelitian terkait penemuan dan pengembangan obat, penelusuran aktivitas kandidat obat secara *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* merupakan langkah penting untuk memastikan potensi dan keamanan suatu senyawa sebelum melanjutkan ke uji klinis (Cattelani et al., 2024; Komura et al., 2023; Roney & Aluwi, 2024; Sree Kommalapati et al., 2023). Pendekatan *in silico* bertujuan untuk memprediksi aktivitas farmakologis dan interaksi molekul kandidat obat dengan target biologis menggunakan metode komputasi, sehingga menghemat waktu dan biaya pada tahap awal penelitian, seperti *molecular docking* (Roney & Aluwi, 2024; Sree Kommalapati et al., 2023). Selanjutnya, uji *in vitro* digunakan untuk mengevaluasi aktivitas biologis dan toksisitas kandidat obat secara langsung pada sel atau jaringan di luar organisme hidup, memberikan data yang lebih konkret mengenai efektivitas dan keamanan kandidat obat (Cattelani et al., 2024). Sementara itu, uji *in vivo*, yang melibatkan organisme hidup, bertujuan untuk memastikan keamanan, efektivitas, serta efek farmakokinetik dan farmakodinamik kandidat obat dalam sistem biologis yang kompleks (Komura et al., 2023). Kombinasi dari ketiga pendekatan ini memungkinkan proses pengembangan obat dilakukan secara sistematis, efisien, dan akurat.

Salah satu senyawa yang telah diketahui memiliki efek anti-hiperglikemik adalah asam kafeat (Aijaz et al., 2022; Akhlaghipour et al., 2023; Ganguly et al., 2023). Asam kafeat merupakan senyawa fenolik yang ditemukan dalam berbagai buah-buahan seperti kiwi, wortel, tomat, dan madu (Ehtiati et al., 2023; Vinayagam et al., 2016). Senyawa ini memiliki beberapa manfaat kesehatan, termasuk sebagai anti-hipertensi (Bhullar et al., 2014), anti-inflamasi (Taïlé et al., 2022), meningkatkan sistem imun (Ahmadifar et al., 2022), serta menurunkan kadar glukosa darah (Oršolić et al., 2021). Berbagai studi *in silico* telah mengungkap aktivitas asam kafeat terhadap target molekuler seperti α -glukosidase dan DPP-4 (Istyastono et al., 2023). Studi *in vitro* juga menunjukkan kemampuan senyawa ini dalam menghambat enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme glukosa (Tang et al., 2024).

eksperimen *in vivo* pada organisme model, seperti tikus, tidak positif asam kafeat terhadap kadar insulin. Namun, yang mendasari efeknya pada stres seluler dan apoptosis selulernya dipahami (Oršolić et al., 2021). Hasil penelitian ini berpotensi asam kafeat untuk dikaji lebih lanjut dan sebagai agen anti-hiperglikemik.



Hewan model yang umum digunakan dalam penelitian diabetes melitus adalah mamalia. Namun, dengan prinsip 3R (*replacement, reduction, dan refinement*), kesejahteraan mamalia kini harus diperhatikan. Oleh karena itu, banyak peneliti mulai beralih menggunakan organisme model lain untuk pengujian kandidat obat, salah satunya adalah *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*). Penggunaan *D. melanogaster* memiliki banyak keunggulan, seperti kesamaan genetik dengan manusia sekitar 75%, biaya pemeliharaan yang lebih rendah, dan tidak memerlukan izin etik. Selain itu, meskipun *D. melanogaster* tidak memiliki pankreas, tetapi memiliki reseptor insulin (InR) dan sel penghasil insulin (*Insulin-Producing Cells* atau IPC) yang memiliki fungsi serupa dengan pankreas manusia. *D. melanogaster* mensintesis *Drosophila Insulin-Like Protein* (DILP) melalui IPC, yang bekerja mirip dengan insulin pada manusia (Nainu, 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi asam kafeat sebagai agen anti-hiperglikemik, khususnya terkait pengaruhnya terhadap PTP1B. Selain menggunakan metode *in silico*, penelitian ini juga melibatkan pendekatan *in vivo* menggunakan model hiperglikemia pada larva *D. melanogaster*. *D. melanogaster* betina dapat menghasilkan keturunan dalam jumlah besar dalam waktu singkat, sehingga memungkinkan eksperimen skala besar. Selain itu, siklus hidupnya yang relatif singkat, sekitar 2-3 bulan, menjadikannya model ideal untuk studi yang cepat (Nainu, 2018). Organisme model alternatif ini telah banyak digunakan dalam penelitian tentang infeksi, metabolisme, dan imunitas (Rundell & Baranski, 2024; Touré et al., 2023; Westlake et al., 2024). Dengan menggunakan *D. melanogaster*, kita dapat mengungkapkan berbagai misteri ilmiah, terutama dalam studi genetika atau biologi molekuler, yang sangat relevan terutama di negara berkembang seperti Indonesia.

Dengan menggabungkan *D. melanogaster* sebagai model *in vivo* dan *molecular docking* secara *in silico*, penelitian ini bertujuan untuk memberikan wawasan yang komprehensif mengenai potensi asam kafeat sebagai agen terapeutik dalam pengelolaan hiperglikemia. Pendekatan ini tidak hanya berkontribusi pada pemahaman efek farmakologis asam kafeat, tetapi juga menawarkan metode yang hemat biaya dan etis untuk memajukan penelitian terkait hiperglikemia.



1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana mekanisme kerja asam kafeat sebagai anti-hiperglikemia pada *D. melanogaster* secara *in silico* dan *in vivo*.
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi asam kafeat sebagai anti-hiperglikemia pada *D. melanogaster* secara *in vivo*
3. Konsentrasi berapa asam kafeat dapat memberikan efek sebagai anti-hiperglikemia yang efektif pada *D. melanogaster*

1.3 Tujuan Penulisan

Berdasarkan uraian rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

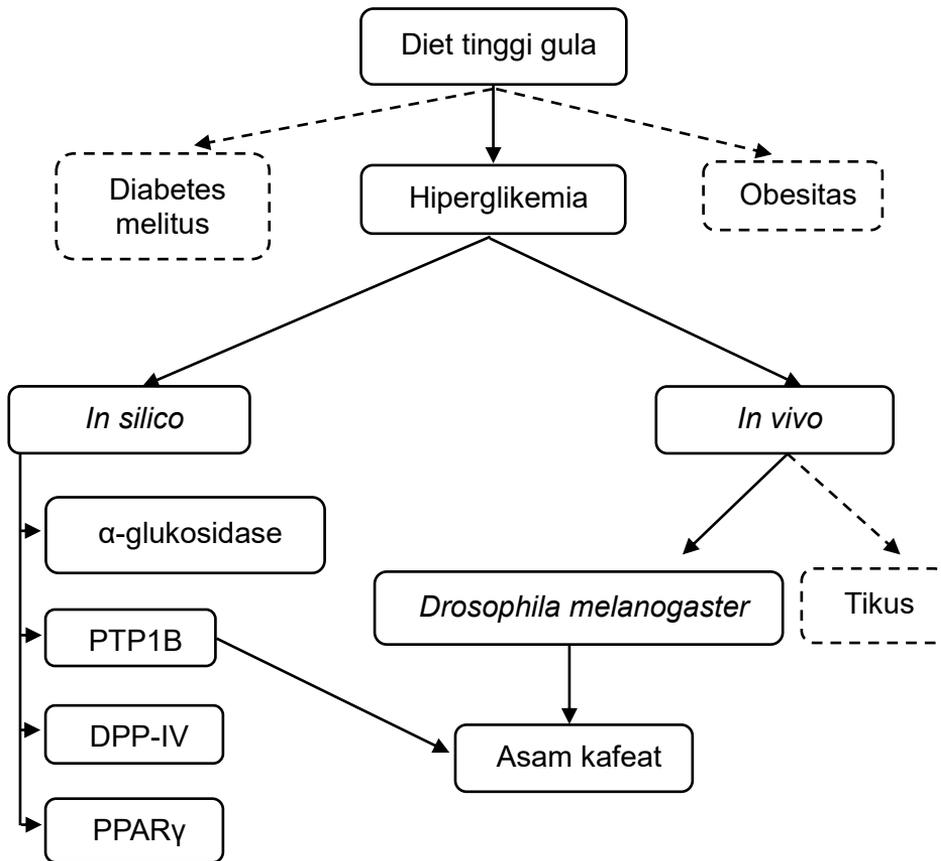
1. Untuk mengeksplorasi mekanisme kerja asam kafeat sebagai anti-hiperglikemia pada *D. melanogaster* secara *in silico* dan *in vivo*
2. Untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi asam kafeat sebagai anti-hiperglikemia pada *D. melanogaster* secara *in vivo*
3. Menentukan konsentrasi asam kafeat yang dapat memberikan efek sebagai anti-hiperglikemia yang efektif pada *D. melanogaster*

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi, menambah wawasan serta menjadi landasan yang kuat dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang ilmu farmasi mengenai asam kafeat sebagai anti-hiperglikemia secara *in silico* dan *in vivo* dengan model *D. melanogaster*



1.5 Kerangka Teori



Ket:

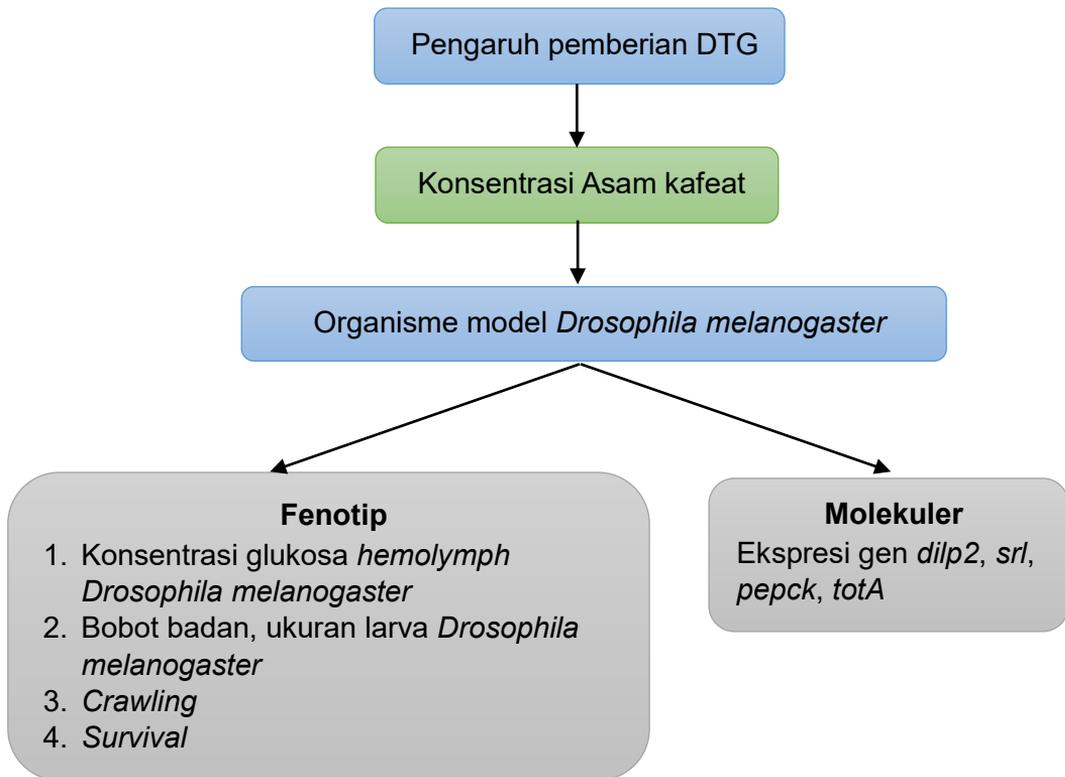
———— Dilakukan pada penelitian

- - - - - Tidak dilakukan pada Penelitian



Gambar 1. Kerangka Teori

1.6 Kerangka Konsep



Variabel kontrol

Variabel bebas

Variabel terikat



Gambar 2. Kerangka konsep

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengeksplorasi efek asam kafeat sebagai anti-hiperglikemia pada *D. melanogaster* melalui pendekatan *in silico* dan *in vivo*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi-Toksikologi dan Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Thermal cycler qPCR (RotorGene Q, Qiagen[®]), spin cartridge (InvitrogenTM), kompor listrik (IKA C-MAG HS[®]), mikropipet (Dragonlab), papan CO₂ (CO₂ stage), timbangan analitik (Ohaus[®]), tip mikropipet (Gen Follower[®]), micropestle, zoom stereo microscope (Motic[®]), vial (Biologix[®]), plug vial (Biologix[®]), jangka sorong analitik, dan alat-alat gelas (Pyrex[®]).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam kafeat (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), *Drosophila melanogaster* genotip *w¹¹¹⁸* (*wildtype*) (Laboratory Host Defense and Responses, Kanazawa University), SuperScriptTM III RT/Platinum[®] SYBR[®] Green One-Step Qrt-PCR with ROX (InvitrogenTM), PureLinkTM RNA Mini Kit (InvitrogenTM), primer *dilp2*, primer *srl*, primer *pepck*, primer *totA*, *treff* tube (Treff lab[®]), agar (Swallow[®]), alkohol 70%, air mineral (AQUA[®]), asam kafeat, asam propionat, brewer's yeast, metil paraben, natrium klorida 0,9%, sukrosa dan tepung jagung.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Penyiapan hewan uji (*Drosophila melanogaster*)

Pada penelitian ini menggunakan larva instar 3 *D. melanogaster* jenis *w¹¹¹⁸* sebagai organisme model yang diperoleh dari *Laboratory Host Defense and awa University*, Jepang. Lalat yang telah dipelihara dan di dalam pakan normal, lalat tersebut dipindahkan ke vial diberikan CO₂ untuk mempermudah pengambilan lalat hari. Masing-masing terdapat lima pasang lalat *D.* antan dan 5 betina) di dalam vial yang berisi pakan normal, pakan DTG, pakan DTG + asam kafeat dengan



tiga konsentrasi), disimpan pada suhu sekitar 25°C. Lalat tersebut dikawinkan dengan tujuan untuk memperoleh larva instar tiga untuk digunakan dalam penelitian.

Desain eksperimen terdiri atas lima kelompok, yaitu kelompok kontrol tanpa perlakuan (normal), kelompok diet tinggi gula (DTG), kelompok DTG + asam kafeat 31,25 µM, kelompok DTG + asam kafeat 125 µM, kelompok DTG + asam kafeat 500 µM. Setiap kelompok terdiri atas lima replikasi yang digunakan untuk pengukuran kadar glukosa *hemolymph*, pengukuran ukuran tubuh larva, *crawling*, analisis *survival* dan analisis ekspresi gen *dilp2*, *srl*, *pepck*, dan *totA*.

2.3.2 Pembuatan pakan *Drosophila melanogaster*

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan pakan terdiri atas tepung jagung, agar, yeast, sukrosa, asam propionat, metil paraben dan air. Pembuatan pakan untuk 100 mL mengandung tepung jagung 7,5 g, sukrosa 4,5 g, agar 0,9 g, yeast 3 g, metil paraben 15% sebanyak 450 µL, asam propionat 400 µL, dan air dicukupkan hingga 100 mL. Selanjutnya, tepung jagung, yeast, sukrosa, dan agar dimasukkan dan dicampurkan dalam beaker ukuran 250 mL. Dicukupkan air hingga 100 mL ke dalam beaker dan dihomogenkan. Campuran tersebut dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* pada suhu 100°C selama ± 1 jam sambil diaduk terus-menerus hingga mengental. Apabila telah mengental, metil paraben dan asam propionat ditambahkan ke dalam campuran pakan menggunakan *micropipette*, lalu diaduk kembali hingga homogen, ditambahkan larutan asam kafeat sesuai dengan perhitungan dan kelompok perlakuan (kelompok DTG + asam kafeat 31,25 µM, kelompok DTG + asam kafeat 125 µM, kelompok DTG + asam kafeat 500 µM). Campuran akhir tersebut dituang ke dalam masing-masing vial *D. melanogaster*, dibiarkan hingga memadat. Sedangkan untuk kontrol diet tinggi gula (DTG) dan kontrol perlakuan asam kafeat mengandung sukrosa 30% dari jumlah gula normal. Komposisi pakan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Komposisi pakan *Drosophila melanogaster*

Komposisi	Normal	Diet Tinggi Gula (DTG)
	7,5 g	7,5 g
	2,5 g	2,5 g
	0,9 g	0,9 g
	4,5 g	30 g (Ecker et al., 2017)
	400 µL	400 µL
	450 µL	450 µL
	Ad 100 mL	Ad 100 mL

2.3.3 *In silico*

2.3.3.1 Preparasi ligan

Struktur asam kafeat diambil dari basis data PubChem. Format SMILES kanonik diubah menjadi file PDB menggunakan perangkat lunak UCSF Chimera[®]. Hidrogen polar dan muatan Gasteiger ditambahkan pada ligan menggunakan alat "*Minimize*" di UCSF Chimera[®] (Amengor et al., 2024). Langkah ini bertujuan untuk meminimalkan energi ligan dan mengoptimalkan geometri molekulnya untuk analisis *docking* selanjutnya (Mert-Ozupek et al., 2022).

2.3.3.2 Preparasi protein

Struktur kristal protein target, yaitu *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B), diperoleh dari *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB). Protein tersebut dipersiapkan menggunakan opsi "Dock Prep" pada UCSF Chimera[®], yang mencakup penambahan atom hidrogen, koreksi rantai samping yang tidak lengkap, penetapan muatan, dan penghapusan molekul pelarut. Struktur protein yang telah dipersiapkan disimpan dalam format PDB untuk memastikan kompatibilitas dengan AutoDock Vina dan alat visualisasi seperti Biovia Discovery Studio (Amengor et al., 2024).

2.3.3.3 *Molecular docking*

Struktur ligan dan protein yang telah dipersiapkan diimpor ke dalam UCSF Chimera[®], yang terintegrasi dengan AutoDock Vina, untuk melakukan *molecular docking*. Sebuah grid box didefinisikan di sekitar kantung pengikatan protein, yang menentukan ukuran dan lokasi untuk *docking* yang terlokalisasi. Simulasi *docking* dilakukan untuk memprediksi mode pengikatan dan afinitas asam kafeat dengan target protein. Analisis *pasca-docking* dilakukan untuk mengevaluasi interaksi antara ligan dan protein, termasuk ikatan hidrogen, dan afinitas pengikatan. Hasil *docking* kemudian divalidasi lebih lanjut dan divisualisasikan menggunakan Biovia Discovery Studio untuk memastikan akurasi *docking* dan menilai interaksi penting dalam situs aktif (Amengor et al., 2024).



dynamic

Simulasi dinamika molekuler (MD) dilakukan menggunakan perangkat lunak GROMACS (GROMACS Development Team, 2017) atau SASA Bioscience GmbH, Vienna, Austria) untuk memastikan stabilitas konformasi terbaik yang diperoleh dari hasil *docking* (Land & Humble, 2018). Metode yang digunakan adalah

force field Amber14 dengan penerapan kondisi batas periodik. Suhu sistem dijaga pada 310 K, dan pH dipertahankan pada 7,4. Untuk menjaga keseimbangan sistem, ditambahkan molekul air TIP3P sebagai pelarut serta ion penyeimbang (Na^+ dan Cl^-). Simulasi dijalankan selama 100 ns dengan *timestep* 0,25 femtosekon. Parameter seperti *Radius of gyration*, RMSD dan RMSF dianalisis setiap 25 pikosekon (Rasyid et al., 2023).

2.3.4 Pengukuran kadar glukosa hemolymph *Drosophila melanogaster*

Pengujian ini dilakukan ketika larva instar tiga berada di dinding vial. Pada hari ke-9 dilakukan pengukuran kadar glukosa hemolymph *D. melanogaster* setelah diberikan perlakuan (kelompok kontrol normal, kelompok DTG, dan kelompok DTG + asam kafeat 31,25 μM , kelompok DTG + asam kafeat 125 μM , kelompok DTG + asam kafeat 500 μM), setiap perlakuan disiapkan dalam *ependorf tube* terpisah. Sebanyak 70-100 larva instar tiga yang telah dibersihkan menggunakan NaCl 0,9% dimasukkan ke dalam *ependorf tube* untuk memperoleh 10 μL hemolymph *D. melanogaster* (Lourido et al., 2021). Larva tersebut dihancurkan menggunakan *micropestle*, kemudian disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 16.000 rpm. Setelah proses sentrifugasi, sebanyak 10 μL supernatan dipipet dan dicampurkan ke dalam tabung microcentrifuge yang berisi 1 mL reagen GOD-PAP (*Glucose Oxidase–Peroxidase Aminoantypirin*). Campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Absorbansi campuran diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai pembanding, absorbansi larutan standar dengan kadar glukosa 100 mg/dL juga diukur. Kadar glukosa hemolymph *D. melanogaster* dihitung menggunakan rumus berikut:

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

2.3.5 Pengukuran bobot badan dan ukuran larva *Drosophila*



ter

akukan pada hari ke-9 setelah diberikan perlakuan DTG + asam kafeat 31,25 μM , kelompok DTG + asam kafeat 125 μM , kelompok DTG + asam kafeat 500 μM . masing-masing tiga larva dari masing-masing lima kelompok yang berbeda. Larva tersebut dicuci dengan NaCl 0,9% untuk menghilangkan sisa makanan kemudian

dikeringkan menggunakan kertas penyerap air. ditimbang bobot badan larva menggunakan timbangan analitik (Sartorius®) (Abdulazeez et al., 2022). Selanjutnya dilakukan pengukuran panjang dan lebar larva menggunakan jangka sorong analitik dan microscope. Adapun kelompok uji yang digunakan yaitu kelompok kontrol normal, kelompok diet tinggi gula (sukrosa 30%), kelompok DTG + asam kafeat 31,25 μM , kelompok DTG + asam kafeat 125 μM , dan kelompok DTG + asam kafeat 500 μM .

2.3.6 Uji *crawling*

Pada hari ke-9, larva instar tiga digunakan untuk semua perlakuan, dengan tiga larva untuk setiap kontrol perlakuan. Setiap larva diamati pergerakannya di cawan petri yang berisi 20 mL media agar 2%, dengan dasar kertas milimeter blok. Aktivitas merangkak larva diukur dalam milimeter per menit. Selama pengamatan 1 menit, jumlah kotak yang dilalui oleh setiap larva instar tiga dicatat, dan dilakukan tiga kali pengulangan (Nayak & Mishra, 2021).

2.3.7 Analisis *Survival*

Analisis kelangsungan hidup dilakukan untuk mengukur durasi yang dibutuhkan dari fase larva hingga menjadi lalat dewasa. Pada hari ke-6, larva instar 2 (F1) dari kelompok perlakuan dimasukkan ke dalam vial yang berisi pakan normal, DTG, DTG + asam kafeat 31,25 μM , DTG + asam kafeat 125 μM , dan DTG + asam kafeat 500 μM , dengan setiap vial berisi 10 larva. Observasi dilakukan untuk mencatat jumlah larva, pupa, dan lalat dewasa yang tetap hidup hingga semua lalat dalam kelompok percobaan mati (Asfa et al., 2023).

2.3.8 Penyiapan Sampel RNA

Isolasi RNA dilakukan menggunakan RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit (Invitrogen®). Sepuluh larva *D. melanogaster* yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube*. Disiapkan reagen *lysis buffer* segar yang telah dicampur *2-mercaptoethanol* dengan komposisi setiap 300 μL *lysis buffer* untuk setiap sampel ditambahkan *2-mercaptoethanol* sebanyak 1% dari total volume *lysis buffer*. Setelah itu, campuran tersebut ditambahkan ke



be sampel dan larva dihancurkan menggunakan sentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. yang diperoleh ditransfer ke tube baru kemudian etanol sebanyak 300 μL dan divortex selama 10 detik. Sampel *cartridge* dan disentrifugasi selama 15 detik kecepatan ses diulangi sebanyak dua kali. Setelah dilakukan

pengulangan maka filtrat dibuang lalu *spin cartridge* dimasukkan kembali pada tube yang sama. Larutan *Wash Buffer I* ditambahkan ke dalam *spin cartridge* sebanyak 700 μL dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang. Filtrat dibuang dan *spin cartridge* dipindahkan pada *collection tube* baru, selanjutnya etanol 96% sebanyak 500 μL ditambahkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang selama 15 detik. Proses tersebut diulangi sebanyak dua kali (Ambion, 2012).

Setelah dilakukan proses pengulangan sebanyak dua kali maka *spin cartridge* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang selama 1 menit. Selanjutnya, sebanyak 40 μL RNase free water ditambahkan ke bagian tengah *spin cartridge*. Adapun proses tersebut diulang kembali dengan menambahkan RNase free water sebanyak 40 μL . Setelah itu, *spin cartridge* dibuang dan *collection tube* yang mengandung RNA disimpan pada suhu -80°C (Ambion, 2012).

2.3.9 Analisis ekspresi gen

Pengukuran tingkat ekspresi gen *dilp2*, *srl*, *pepck*, dan *totA* dilakukan menggunakan *real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR)* dengan *Universal One-Step RT-qPCR Kit* (Luna®). *Real-time RT-qPCR* dilakukan menggunakan dua set primer untuk setiap gen, dengan urutan primer dan kondisi PCR dirinci dalam Tabel 2. Reaksi RT-PCR dilakukan dalam tabung qPCR dengan total volume 10 μL , terdiri atas 5 μL 2X SYBR® *Green Reaction Mix* dengan ROX, 0,9 μL *Nuclease-Free Water* (NFW), 0,1 μL *Reverse Transcriptase* (RT), 2 μL primer, dan 2 μL sampel. Reaksi dijalankan pada mesin *RotorGene Q* (Qiagen) dengan kondisi awal 37°C selama 15 menit, diikuti oleh 40 siklus PCR. Setiap siklus terdiri atas 15 detik pada suhu 95°C dan 30 detik pada suhu 60°C . Setelah 40 siklus selesai, dilakukan analisis *melt curve* yang dimulai pada suhu 40°C selama 1 menit (Rosa et al., 2021).

Tabel 2. Primer yang digunakan dalam uji RT-qPCR

Gen	Primer maju	Primer terbalik
<i>dilp2</i>	5'-TCTGCAGTGAAGCTCAACGA-3'	5'-CAAACCTGCAGGGGATTGAGG-3'
<i>totA</i>	5'CCAAAATGAATTCTTCAACTGCT-3'	5'-GAATAGCCCATGCATAGAGGAC-3'
	AGTCCGAGATCCGCAA-3'	5'-GGGACCGCGAGCTGATGGTT-3'
	AGAACCTTATTGTG-3'	5'-AGAATCAACATGTGCTCGGC-3'
	AGGGACAGTATCTG-3'	5'-AAACGCGGTTCTGCATGAG-3'

a insulin like peptides), *totA* (torandot A), *srl* (spargel), *pepck e Carboxykinase*, dan *rp49* (ribosomal protein 49)



2.3.10 Analisis Statistik

Data kadar glukosa *hemolymph*, ukuran tubuh larva, bobot badan, dan uji pergerakan dianalisis secara statistik menggunakan *Student's t-test* atau *One-Way ANOVA* yang diikuti dengan analisis post hoc. Hasil disajikan dalam bentuk rata-rata \pm standar deviasi (SD), dengan nilai *p* kurang dari 0,05 dianggap signifikan secara statistik. Seluruh data diolah dan divisualisasikan menggunakan GraphPad Prism® 9

