

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas adalah kondisi yang ditandai dengan akumulasi lemak tubuh yang abnormal atau berlebihan, sering didefinisikan dengan indeks massa tubuh (IMT) yang melebihi $30,0 \text{ kg/m}^2$ (Jeong et al., 2024). Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), sekitar 150 juta orang dewasa berusia 18 tahun ke atas mengalami obesitas pada tahun 2023 (Chandrasekaran & Weiskirchen, 2024; Lobstein et al., 2022; Ong et al., 2023). Berdasarkan RISKESDAS (Riset dasar kesehatan) prevalensi kegemukan di Indonesia mengalami peningkatan, dari 10,5% pada 2007 menjadi 14,8% pada 2013 dan 21,8% pada 2018. Menurut hasil survei kesehatan Indonesia tahun 2023, angka obesitas di Indonesia meningkat menjadi 23,4% (Ferdina et al., 2024). Obesitas dapat meningkatkan risiko terjadinya berbagai penyakit kronis, termasuk di antaranya adalah diabetes. Diabetes adalah suatu kondisi yang ditandai dengan peningkatan gula darah yang tinggi dalam waktu yang lama. Diabetes dengan obesitas dapat menyebabkan terjadinya resistensi insulin, peradangan kronis, dan kelebihan lemak visceral. Studi menunjukkan bahwa orang dengan obesitas memiliki risiko 8 kali lebih tinggi terkena diabetes dibandingkan berat badan normal (Safaei et al., 2021).

Penggunaan obat-obat untuk mengatasi diabetes sering digunakan pada kasus obesitas dengan komplikasi diabetes. Akan tetapi, risiko timbulnya efek samping yang cukup mengganggu telah mendorong pencarian alternatif pengobatan (Müller et al., 2022). Penggunaan beberapa suplemen makanan atau vitamin, seperti misalnya vitamin D₃. Pada kasus obesitas dan diabetes menunjukkan hasil yang baik (Argano et al., 2023). Menurut *Cristiano et al.* (2023) suplementasi vitamin D₃ dapat menurunkan HbA1c plasma dan meningkatkan fungsi sel beta pankreas melalui homeostasis energi dan mencegah peradangan (Szymczak-Pajor et al., 2020). Vitamin D₃ terbukti menurunkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) di adiposit/adiposa melalui regulasi ekspresi NADPH oksidase yang bertanggung jawab dalam produksi ROS (Malacrida et al., 2022).

Peningkatan ROS pada kondisi obesitas komplikasi diabetes dapat memengaruhi aktivitas transkripsi *Nuclear Factor κB* (NF-κB) dan mengubah ekspresi gen yang terlibat dalam overproduksi sitokin pro-inflamasi (Furukawa et al., 2017; Masenga et al., 2023; Pinti et al., 2019). Gen-gen yang berperan pada kondisi obesitas komplikasi diabetes seperti gen *Akh* dan *trbl* yang berperan pada proses metabolisme lemak dan protein cukup sulit untuk dibuktikan karena tingkat eksperimen yang cukup tinggi (Herberg & Coleman, 1977; Loos & Yeo, 2022). Namun melalui penggunaan organisme model *Drosophila melanogaster*, sejumlah kesulitan tersebut telah dapat diatasi dan memudahkan peneliti untuk memahami hubungan tripartit obesitas-inflamasi-diabetes.

Drosophila melanogaster, atau lalat buah, telah berhasil digunakan sebagai organisme model dalam penelitian biomedik selama beberapa dekade. Keberhasilan ini ditunjang oleh fakta bahwa lalat buah memiliki homolog sekitar 75% dari seluruh gen yang diketahui terkait dengan penyakit pada manusia (Nainu et al., 2023; Nainu et al., 2019). Dalam konteks *D. melanogaster*, nutrisi diproses menggunakan bantuan *Drosophila insulin-like proteins* (Dilps) dan diabsorpsi di usus tengah, lalu disimpan dalam tubuh lemak dan oenosit perifer. Struktur ini analog dengan fungsi jaringan hati dan adiposa pada mamalia, memberikan dasar yang kokoh untuk penelitian lebih lanjut terkait komplikasi obesitas-diabetes (Asbah et al., 2021; Nainu et al., 2023).

D. melanogaster merupakan model uji yang sudah digunakan untuk melihat model obesitas dan diabetes melitus tipe 2 (Musselman & Kühnlein, 2018; Trinh & Boulianne, 2013) (Baenas & Wagner, 2022). Menurut (Merigliano et al., 2018; Neamtu et al., 2020) penggunaan *D. Melanogaster* menggunakan Vitamin B6 pada model diabetes melitus dan bilberry pada model obesitas telah dilakukan namun untuk pemodelan komplikasi obesitas diabetes belum dilaporkan. Oleh karena itu, di dalam penelitian ini akan dikembangkan platform pemodelan obesitas komplikasi diabetes melitus pada organisme *D. melanogaster* yang selanjutnya akan digunakan dalam pengujian efek farmakologi vitamin D₃ pada kondisi tersebut. Penelitian ini diharapkan menjadi inovasi riset yang dapat memberi informasi baru tentang potensi vitamin D₃ sebagai *supporting supplement* pada model *D. melanogaster* komplikasi obesitas-diabetes.



asalah

vitamin D₃ dapat menangani kondisi komplikasi obesitas-diabetes pada organisme *gaster* ?

2. Bagaimana mekanisme vitamin D₃ dalam menangani komplikasi obesitas-diabetes pada organisme *D.melanogaster* ?

1.3 Tujuan Masalah

1. Mengevaluasi efek vitamin D₃ pada model obesitas-diabetes *D. melanogaster*
2. Mengetahui mekanisme vitamin D₃ dalam menangani komplikasi obesitas-diabetes pada organisme *D. melanogaster*

1.4 Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan menjadi landasan yang kuat dalam pengembangan ilmu pengetahuan di bidang ilmu farmasi khususnya dalam efek vitamin D₃ pada pemodelan komplikasi obesitas-diabetes menggunakan *Drosophila melanogaster*.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Farmakologi-Toksikologi dan laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2 Alat dan bahan penelitian

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

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Drosophila melanogaster* jenis *wild type W¹¹¹⁸* (*Laboratory Host Defense and Responses*, Kanazawa University), agar (Swallow[®]), air suling, NaCl, asampropionat, *brewer's yeast*, metil paraben, natrium klorida 0,9%, primer *dilp2, dilp5*, primer *Akh*, primer *trbl*, primer *sod 1*, primer *cat*, *PureLinkTM RNA Mini Kit* (InvitrogenTM), *SuperScriptTM III RT/Platinum[®] SYBR[®] Green One-Step Qrt-PCR with ROX* (InvitrogenTM), sukrosa, tepung jagung dan treff tube (Treff lab[®]).

2.3 Metode penelitian

2.3.1 Penyiapan Hewan Coba

Lalat buah *Drosophila melanogaster* yang digunakan yaitu strain *wild type W¹¹¹⁸* yang diadopsi dari *Laboratory Host Defense and Responses* (Kanazawa University). Lalat buah yang berusia 4-7 hari dipelihara dalam vial yang sudah diberi pakan dan disimpan pada suhu 25°C. Lalat dipindahkan pada pakan baru setiap 3-5 hari.

2.3.2 Penyiapan Larutan Vitamin D₃

Larutan vitamin D₃ diencerkan dengan pelarut yang mengandung pelarut tween 80 1 % (1g dalam 10 mL aquades) dan PEG 40 1% (1g dalam 100 mL aquades). Dibuat larutan stock vitamin D₃ dengan konsentrasi mM kedalam campuran larutan tween 80 1 % dan PEG 40 1 %. Setelah dibuat larutan stock maka dibuat serial pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 1000 mM, 100 mM, 10 mM (Hardiyanti et al., 2024).



akan Perlakuan *Drosophila melanogaster*

lakukan *D. melanogaster* dengan menimbang bahan yang diantaranya tepung jagung, ragi, agar, dan sukrosa. Bahan gelas beaker dan ditambahkan air suling sebanyak 100 mL menggunakan batang pengaduk. Setelah itu, dipanaskan di pada suhu 100°C sambil diaduk sampai matang. Setelah n asam propionat dan metil paraben sebagai pengawet.

Kandungan dan Nilai Energi dari Diet Kontrol (CD), Diet Tinggi Lemak (DTL). Terlihat pada **Tabel.1**

Tabel 1. komposisi pakan perlakuan

komposisi	Kontrol	DTL	DTL + Vit.D3
Tepung jagung (g)	7.5	7.5	7.5
Ragi (g)	3	3	3
Agar (g)	0.9	0.9	0.9
gula (g)	4.5	4.5	4.5
VCO (%)	-	2	2
Asam propionat(mL)	400	400	400
Methyl paraben (mL)	450	450	450
Vitamin D ₃	-	-	10 mM, 100 mM, 1000 mM
Ad Aqua (mL)	100 ml	100 ml	100 ml

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan VCO dalam konsentrasi 2% dapat menginduksi obesitas dan diabetes melitus tipe 2 pada *D. Melanogaster* (Nayak & Mishra, 2021).

2.3.4 Pengelompokan Hewan Uji *D. melanogaster*

D. melanogaster yang digunakan dibagi dalam lima kelompok uji :

- I. Kelompok Kontrol tanpa perlakuan (*wild type w¹¹¹⁸*, yang diberi pakan normal)
- II. Kelompok Kontrol negatif (*wild type w¹¹¹⁸*, yang diberi pakan Diet Tinggi lemak 2%)
- III. Kelompok Perlakuan konsentrasi (*wild type w¹¹¹⁸* yang diberi pakan Diet Tinggi lemak 2% ,vitamin D₃ 10 mmol))
- IV. Kelompok Perlakuan konsentrasi (*wild type w¹¹¹⁸* yang diberi pakan Diet Tinggi lemak 2% ,vitamin D₃ 100 mmol))
- V. Kelompok Perlakuan konsentrasi (*wild type w¹¹¹⁸* yang diberi pakan Diet Tinggi lemak 2% ,vitamin D₃ 1000 mmol))



2.3.5 Analisis Fenotip

2.3.5.1 Analisis durasi perkembangan

Analisis durasi perkembangan dilakukan untuk mengamati pengaruh pemberian DTL dan Vitamin D₃ terhadap perkembangan *D. melanogaster*. Pengujian dilakukan berdasarkan metode sebelumnya dengan sedikit modifikasi (Pasco & Léopold, 2012). Pengujian dimulai dengan mengawinkan lima ekor lalat betina virgin (berumur 3-5 hari setelah eklosi) dan lima ekor lalat jantan di dalam pakan perlakuan. Lalat dibiarkan kawin selama 48 jam, kemudian diamati waktu perubahan dari tahap embrio menjadi pupa dan dari pupa menjadi imago (lalat dewasa).

2.3.5.2 Analisis ukuran dan bobot tubuh

Pengukuran panjang, lebar dan bobot badan *D. melanogaster* dilakukan pada larva instar tiga yang dicuci menggunakan larutan 0,9% NaCl untuk menghilangkan sisa makanan kemudian dikeringkan. Uji bobot badan digunakan 10 larva instar tiga pada setiap kelompok untuk mendapatkan bobot rata-rata menggunakan timbangan analitik (Lourido et al., 2021).

2.3.5.3 Analisis crawling

Uji merangkak dilakukan dengan mengikuti metode yang dijelaskan sebelumnya (Nichols et al., 2012). Tujuan dari uji ini adalah untuk mengevaluasi dampak dari DTL pada aktivitas motorik larva *D. melanogaster*. Larva instar ketiga dari setiap kelompok perlakuan ditempatkan pada cawan Petri yang berisi agar 2%. Aktivitas merangkak mereka diamati selama 1 menit, di mana jumlah kotak yang dilalui oleh larva dicatat. Setiap kotak pada kertas kisi berukuran 1 mm x 1 mm.

2.3.5.4 Analisis kadar glukosa dan kolesterol *hemolymph*

Pengujian kadar kolesterol dan glukosa dalam hemolimfa *Drosophila melanogaster* diukur menggunakan protokol yang telah ditetapkan sebelumnya (Lourido et al., 2021) dengan sedikit modifikasi. Hemolimfa diekstraksi dari 70 larva instar ketiga (Lourido et al., 2021), yang dicuci dengan larutan 0,9% NaCl, dihancurkan dalam mikrotube menggunakan mikropestel, dan kemudian diencerkan dengan 20 µL larutan 0,9% NaCl. Kadar kolesterol dan glukosa dikuantifikasi menggunakan reagen Glukosa Oksidase–Peroksidase Aminoantipirin (GOD-PAP) (Glory Diagnostics, Barcelona, Spanyol) dan Standbio Kolesterol Liquicolor (Stanbio Lab, Texas, AS), sesuai dengan petunjuk pabrik. Pembacaan absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer (Shimadzu UV-Vis 1800, Kyoto, Jepang) pada panjang gelombang 595 nm.

2.3.5.5 Analisis kadar ROS (Reactive Oxygen Species)

Untuk mengukur tingkat ROS dalam hemolimfa larva instar ketiga, dilakukan uji reduksi nitroblue tetrazolium (NBT) sesuai dengan protokol standar (Mishra, 2020). Dalam uji ini, ROS dalam sampel mereduksi NBT (Merck, Frankfurter, Jerman), pewarna kuning, menjadi partikel formazan yang tidak larut, menghasilkan warna biru. Absorbansi pada 595 nm kemudian diukur sebagai indikator konsentrasi ROS. Sebanyak lima puluh larva instar ketiga dikumpulkan, dicuci dengan larutan saline buffer fosfat (PBS) untuk menghilangkan sisa partikel makanan, dan diproses di atas es untuk mencegah melanisasi. Hemolimfa diekstraksi, dan volume Akhir 300 µL disiapkan dengan mencampurkan 100 µL hemolimfa dengan 200 µL PBS 1X, diikuti dengan volume yang sama dari larutan NBT. Campuran reaksi diinkubasi dalam gelap pada suhu ruang selama satu jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 300 µL asam asetat glasial 100%. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan maksimum selama satu menit, dan absorbansi supernatan diukur pada 595 nm setelah pengenceran dengan asam asetat 50%.

2.3.6 Analisis Ekspresi Gen

2.3.6.2 Isolasi RNA



kan menggunakan RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit (Invitrogen®) sesuai (Lourido et al., 2012). Sebanyak 10 larva instar 3 *D. melanogaster* dilarutkan dalam reagen tersebut, dan sentrifugasi. Lisat dipindahkan dan diendapkan dengan etanol 70%. Melalui spin cartridge dengan beberapa langkah pencucian menggunakan buffer yang bebas RNase, kemudian disimpan pada suhu -80°C.

2.3.6.3 Uji Profil Ekspresi Gen menggunakan RT-qPCR

Sebanyak dua puluh larva instar ketiga, yang sebelumnya telah diberi perlakuan dengan senyawa masing-masing, ditempatkan dalam tabung Treff untuk isolasi RNA total menggunakan SV Total RNA Isolation System (Promega), sesuai dengan protokol dari produsen. Tingkat ekspresi gen target dianalisis secara kuantitatif menggunakan reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) dengan Universal One-Step RT-qPCR Kit (Luna®, New England Biolabs, Inc., AS), sesuai dengan petunjuk dari produsen. Reaksi RT-qPCR untuk gen target dilakukan dalam volume 10 µL, dimulai dengan satu siklus pada suhu 37°C selama 15 menit, diikuti dengan 95°C selama 10 menit, dan kemudian 40 siklus yang terdiri dari 95°C selama 10 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Analisis kurva pelelehan standar dilakukan pada setiap pengujian RT-qPCR untuk memastikan amplifikasi spesifik dari produk yang diharapkan. Selain itu, tingkat RNA dari protein ribosomal inang rp49, yang digunakan sebagai kontrol internal, diukur menggunakan primer rp49, mengikuti protokol yang sama seperti gen target. Urutan primer yang digunakan dalam pengujian ini disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Sekuens primer gen

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer(3'-5')
<i>Akh</i>	GCGAAGTCCTCATTGCAGCCGT	CCAATCCGGCGAGAAGGTCAATTG A
<i>cat</i>	TTCCTGGATGAGATGTCGCACT	TTCTGGGTGTGAATGAAGCTGG
<i>Trbl</i>	AAATCGCCGCATTTTCGTCAG	TTAGCCTGGCTGTACTTGGC
<i>Sod 1</i>	AGG TCA ACA TCA CCG ACT CC	GTT GAC TTG CTC AGC TCGTG

keterangan

Akh : Gen **Akh** (*Adipokinetic Hormone*) berfungsi sebagai regulasi metabolisme energi dan homeostasis glukosa

Cat : Gen **catalase** memiliki peran penting dalam melindungi sel dari kerusakan akibat stres oksidatif

Trbl : Gen **tribbles** memiliki peran dalam menghambat aktivasi AKT

Sod1: Gen **superoxide dismutase 1** memiliki peran penting dalam pertahanan terhadap stress oksidatif dan menjaga homeostatis seluler.

2.4 Analisis Data dan Statistik

Analisis data survival menggunakan uji ANOVA digambarkan dalam bentuk. Pada data kadar kolesterol dan glukosa *hemolymph*, ukuran panjang badan, bobot badan dan lokomotor akan dianalisis secara statistik menggunakan *GraphPad Prism*® 9, uji ROS (*reactive oxygen species*) di analisis menggunakan one way anova, sedangkan untuk data analisis ekspresi gen dari RT-qPCR diolah menggunakan perangkat lunak *Qgene* dan dianalisis menggunakan *GraphPad Prism*® 9.

