

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperglikemia merupakan kondisi di mana kadar glukosa dalam darah meningkat secara signifikan. Kondisi ini, jika tidak ditangani dengan baik, dapat menyebabkan penyakit kronis seperti diabetes mellitus tipe 2 (Federation, 2021). Prevalensi diabetes mellitus terus meningkat secara global di mana pada tahun 2021 mencapai 529 juta orang dewasa di antaranya merupakan penderita DM tipe 2. Angka ini diprediksi akan terus meningkat mencapai 1,32 Milyar pada tahun 2050 (Ong & E., 2023). Kondisi diabetes yang tidak terkontrol dapat menimbulkan berbagai komplikasi, baik akut maupun kronis. Komplikasi akut meliputi ketoasidosis diabetik dan koma hiperglikemik, yang dapat mengancam nyawa. Sementara itu, komplikasi kronis mencakup kerusakan pembuluh darah, saraf, ginjal, dan retina mata, serta meningkatkan risiko terkena penyakit kardiovaskular, stroke, dan amputasi. Semua ini dapat menurunkan kualitas hidup dan meningkatkan risiko kematian (Forbes, 2013). Hal ini dikaitkan dengan terjadinya inflamasi kronis pada kondisi hiperglikemia.

Hiperglikemia bersama dengan stres oksidatif, merangsang sekresi berbagai zat biologis aktif yang memicu fosforilasi dan degradasi I κ B melalui jalur kinase I κ B (IKK), yang mengaktifkan *nuclear factor- κ B* (NF- κ B). Sitokin lain mengaktifkan *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT3) melalui jalur Jak1/2. Aktivasi NF- κ B dan STAT3 dalam inti sel meningkatkan produksi sitokin inflamasi, memperburuk peradangan terkait diabetes, serta mendukung sinyal untuk proliferasi dan kelangsungan hidup (Evans, 2002). Dalam konteks diabetes, inflamasi kronis diyakini memainkan peran krusial dalam patogenesis dan komplikasi penyakit tersebut. Hiperglikemia menyebabkan peningkatan pembentukan produk akhir glikasi (AGEs), yang pada gilirannya meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi. Sitokin ini memicu respon inflamasi yang dapat menyebabkan resistensi insulin dalam patogenesis diabetes mellitus tipe 2 (Byun, 2017; Goldberg, 2009). Inflamasi merupakan faktor utama yang memperburuk dan memicu komplikasi pada pasien diabetes mellitus (Forbes, 2013). Oleh karena itu, ada peluang dalam pendekatan pengobatan yang dapat memperbaiki kondisi hiperglikemia melalui penghambatan inflamasi dengan menggunakan obat antiinflamasi nonsteroid, seperti aspirin.

Aspirin merupakan salah satu obat yang umum digunakan untuk mengurangi inflamasi (H. Hammadi et al., 2012). Aspirin dapat mengurangi produksi prostaglandin



menghambat enzim *Cyclooxygenase* (COX) yang bertanggung jawab untuk sintesis prostaglandin, mediator utama inflamasi. Studi telah menunjukkan bahwa aspirin dosis rendah juga memiliki aktivitas sebagai agen yang dapat meningkatkan sensitivitas insulin dengan mengurangi resistensi insulin pada pasien diabetes mellitus (Abdelsadik, 2018; Hundal, 2002). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa aspirin merupakan salah satu langkah penting dalam mengatasi komplikasi

hiperglikemia adalah dengan menurunkan tingkat inflamasi, yang dapat memberikan manfaat bagi individu yang menderita diabetes. Dengan demikian, aspirin dapat menjadi alternatif yang menjanjikan dalam penanganan kedua kondisi tersebut, yaitu hiperglikemia dan inflamasi kronis.

Salah satu organisme model yang sering digunakan adalah lalat *Drosophila melanogaster* (Graham, 2017). Lalat ini memiliki sejumlah keunggulan, di antaranya sistem imun dan gen yang homolog dengan manusia (Buchon, 2014) dan biaya pemeliharaan yang relatif murah serta mudah dibandingkan dengan hewan model lainnya (Firzan Nainu, 2019; Pandey & Nichols, 2011). *D. Melanogaster* dapat menghasilkan keturunan dalam jumlah besar dalam waktu singkat dan masa hidup lalat buah relatif pendek sekitar 2-3 bulan. Untuk itu dilakukan apakah aspirin dapat efektif mengatasi inflamasi dan mekanisme kerja sebagai antihiperglikemia secara *in vivo* dengan menggunakan organisme model *D. melanogaster* *PGRP-LB^A*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah aspirin memiliki efek antihiperglikemia melalui penghambatan inflamasi pada model autoinflamasi-hiperglikemia pada *D. melanogaster* ?
2. Bagaimana mekanisme kerja aspirin dalam menghasilkan efek antihiperglikemia melalui interaksi signaling pathway NF-kB pada model autoinflamasi-hiperglikemia pada *D. melanogaster* ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah aspirin memiliki efek antihiperglikemia melalui penghambatan inflamasi pada model autoinflamasi-hiperglikemia pada *D. melanogaster*
2. Untuk memahami mekanisme kerja aspirin dalam menghasilkan efek antihiperglikemia melalui interaksi signaling pathway NF-kB pada model autoinflamasi-hiperglikemia pada *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 pada pengembangan model pengujian secara *in vivo* untuk penelusuran target terapi maupun kandidat obat baru yang lebih efektif dalam menangani kasus autoinflamasi-hiperglikemia.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan dan Lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Farmakologi-Toksikologi dan Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar. Waktu penelitian terhitung mulai dari perencanaan penelitian, pelaksanaan penelitian dan perolehan hasil penelitian. Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Juni-November 2024.

2.2 Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aspirin (CAS No. 50-78-2, Sigma-Aldrich) 2-mercaptoethanol, agar (Swallow®), air suling, alkohol 70%, asam propionat, brewer's yeast, GOD-PAP (Glory). metil paraben, natrium klorida 0,9%, primer gen (*drs*, *attaA*, *dilp3*, *dilp6*, dan *rp49*), PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™), Universal One-Step RT-qPCR Kit (Luna™), sukrosa (Smart-Lab®), tepung jagung (Mugo®) dan treff tube (Treff lab®).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex®), centrifuge, jangka sorong analitik, kompor listrik (IKA C-MAG HS®), micropestle, mikropipet (Dragonlab), papan CO₂ (CO₂ stage), plug vial (Biologix®), spektrofotometer (Shimadzu UV-Vis 1800), spin cartridge (Invitrogen™), thermal cycler qPCR RotorGene Q, Qiagen®), timbangan analitik (Ohaus®), tip mikropipet (Gen Follower®), vial (Biologix®), dan zoom stereo microscope (Motic®)

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Penyiapan hewan uji (*Drosophila melanogaster*)

Dalam penelitian ini, lalat yang digunakan adalah *D. melanogaster* PGPR-LB^A yang diperoleh dari Laboratorium Pertahanan dan Respons (Kanazawa University, Japan). Lalat tersebut dibesarkan dengan diet standar di bawah kondisi terkontrol, termasuk kelembapan relatif 60%, pada suhu konstan (25°C, siklus terang-gelap 12:12 jam) untuk memastikan pertumbuhan yang optimal.

2.3.2 Pembuatan pakan *D. melanogaster*

Dalam pembuatan pakan *D. melanogaster* bahan-bahan berupa tepung jagung, gula pasir, ragi, agar, dan air steril. Bahan dimasukkan ke dalam gelas beaker dan kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk. Setelah itu, dipanaskan diatas kompor listrik pada suhu 100°C sambil diaduk sampai homogen. Setelah homogen dituangkan ke dalam vial dan ditunggu hingga memadat. Komposisi pakan dan alat pada **tabel 1**.



Tabel 1. Komposisi pakan *D. melanogaster* dan perlakuan

Komposisi	Diet Normal (DN)	Diet Tinggi Gula (DTG)	Diet Tinggi Gula (DTG) + Perlakuan
Tepung jagung (g)	7,5	7,5	7,5
Yeast (g)	2,5	2,5	2,5
Agar-agar (g)	0,9	0,9	0,9
Sukrosa (g)	4,5	30	30
Asam propionat (μ L)	400	400	400
Metil paraben (μ L)	450	450	450
EtOH (%)			3,5
Aspirin (μ M)			0,05 μ M
			0,5 μ M
			5 μ M
Water (mL)	100	100	100

2.3.3 Pengukuran kadar glukosa *hemolimfa D. melanogaster*

Sekitar 70 larva instar ketiga dikumpulkan untuk mendapatkan *hemolimfa* yang akan digunakan dalam pengukuran kadar glukosa (Lourido F, 2021). Larva kemudian ditempatkan dalam tabung mikro dan dihancurkan menggunakan micropestle. *Hemolimfa* yang dihasilkan kemudian di sentrifugasi pada 16.000 rpm selama 2 menit untuk mengeluarkan *hemolimfa*. Sebanyak 10 μ L *hemolimfa* dipipet dan dipindahkan ke tabung mikrocentrifuge yang berisi 1000 μ L reagen *Glucose Oxidase – Peroxidase Aminoantipyrine* (GOD-PAP) (Glory Diagnostics, Barcelona, Spanyol). Campuran tersebut dihomogenkan dengan baik dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer (Shimadzu UV-Vis 1800, Kyoto, Jepang) pada panjang gelombang 500 nm. Larutan standar dengan konsentrasi glukosa 100 mg/dL digunakan sebagai acuan untuk mengukur absorbansi.

2.3.4 Pengukuran bobot badan dan ukuran larva *D. melanogaster*

Pengujian dilakukan dengan menimbang sepuluh larva instar ketiga *PGRP-LB^A* dari masing-masing kelompok yang berbeda menggunakan timbangan analitik. kemudian dihitung rata-rata berat badan setiap kelompok. Setelah itu, panjang dan lebar larva diukur menggunakan kaliper analitik dan mikroskop²³. Kelompok uji yang digunakan dalam penelitian ini meliputi diet normal (DN), diet tinggi gula (DTG), DTG + aspirin 0,05 μ M, DTG + aspirin 0,5 μ M, dan DTG + aspirin 5 μ M (Nayak, F, 2021).



ga *PGRP-LB^A* digunakan untuk semua perlakuan. Setiap larva ditanam dalam cawan petri kaca yang berisi media agar yang dilapisi dengan media. Ukuran larva diukur dalam satuan mm/menit, dengan menghitung waktu yang dibutuhkan oleh larva dalam waktu 1 menit (Nayak, 2021).

2.3.6 Analisis Survival

Analisis survival digunakan untuk mengukur waktu yang dibutuhkan larva untuk berkembang menjadi lalat dewasa. Larva *PGRP-LB^Δ* yang diberi diet tinggi gula (DTG) dimasukkan ke dalam vial yang berisi DN, DTG, DTG + ethanol dan diet masing-masing perlakuan, dengan masing-masing vial berisi sepuluh larva. Penelitian ini dilakukan pada suhu 25°C, dan pakan diganti setiap 3 hari untuk setiap perlakuan pakan. Percobaan dilanjutkan hingga larva berkembang menjadi lalat dewasa. Dilakukan pengamatan jumlah larva yang berhasil bermetamorfosis menjadi pupa, dan jumlah pupa yang berkembang menjadi lalat dewasa. (Ismail JN, 2023).

2.3.7 Analisis Reproduksi

Lima lalat betina *virgin* dan lima lalat jantan *PGRP-LB^Δ* ditempatkan dalam setiap vial perlakuan. Percobaan dibagi menjadi tiga kelompok, dan lalat diberi waktu lima hari untuk bereproduksi. Kemudian dihitung jumlah pupa dan lalat dewasa yang muncul di setiap kelompok (Base NH, 2019; Koliada A, 2020).

2.3.8 Penyiapan sampel RNA

Isolasi RNA dilakukan menggunakan RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit Pure Link RNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, AS). Sepuluh larva instar tiga *D. melanogaster* dilarutkan dalam reagen lysis buffer, dihancurkan, dan disentrifugasi. Lisat dipindahkan dan diendapkan dengan etanol 70%. Sampel diproses melalui spin cartridge dengan beberapa langkah pencucian menggunakan buffer khusus. RNA dielusi dengan RNase free water, kemudian disimpan pada suhu -80°C.

2.3.9 Analisis ekspresi gen

Tingkat ekspresi gen kemudian dianalisis secara kuantitatif menggunakan *reverse transcription quantitative PCR*. (RT-qPCR). Proses RT-qPCR untuk gen target dilakukan dalam reaksi 10 µL menggunakan Universal One-Step RT-qPCR Kit (Luna®, New England Biolabs, Inc., MA, USA), mengikuti pedoman dari produsen. RT-qPCR dengan primer spesifik (Tabel 2) dilakukan dalam volume reaksi 10 µL di RotorGene Q (Qiagen, Jerman), terdiri dari satu siklus pada 37°C selama 15 menit, diikuti oleh 95°C selama 10 menit, dan selanjutnya 40 siklus pada 95°C selama 10 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Analisis kurva lebur standar dilakukan pada setiap uji RT-qPCR untuk memvalidasi amplifikasi spesifik dari produk yang diharapkan. Selain itu, tingkat RNA dari protein ribosom inang *rp49*, yang digunakan sebagai kontrol internal, diperiksa menggunakan seperangkat primer *rp49* mengikuti protokol serupa yang diterapkan pada gen target.

Tabel 2. Sekuens primer gen



Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
CAATCGCTTCTACT	TGGTGGAGTGGGCTTCATG
ATGATCGGCGGTGT	GTTACAGGGGTCCAAAGTTC
AACCTTTTCCAATATGATG	TCC CAG GAC CAC CAG CAT
AGTGAAGGATG	GTTGCTGTGCGTCAAG
TCAAGGGACAGTATCTG	AAACGCGGTTCTGCATGAG

2.3.10 Analisis Statistik

Semua data yang diperoleh dari baik uji fenotipik maupun molekuler dianalisis menggunakan GraphPad Prism 9® (GraphPad Software, Boston, USA). Data tersebut disajikan dalam bentuk grafik batang dan dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA satu arah, diikuti dengan uji post-hoc Tukey. Hasil dinyatakan sebagai nilai rata-rata \pm deviasi standar (rata-rata \pm SD), dengan signifikansi statistik ditentukan pada $p < 0,05$.

