

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Secara global, hampir separuh kematian di bawah usia 70 tahun diakibatkan oleh hiperglikemia, yaitu kondisi meningkatnya kadar glukosa darah melebihi normal (Bohari et al., 2021; Islam et al., 2019). Pada tahun 2021, terdapat 529 juta orang di seluruh dunia yang hidup dengan diabetes, dengan prevalensi 6,1% dari populasi global. Diperkirakan pada tahun 2050, jumlah penderita diabetes akan meningkat menjadi lebih dari 1,31 miliar orang (Ong et al., 2023). Di Indonesia, jumlah penderita diabetes menempati peringkat kelima terbanyak di dunia (atlas, 2021). Kondisi hiperglikemia pada penderita diabetes, yang tidak ditangani dengan baik dapat meningkatkan risiko kerusakan organ seperti mata, ginjal, jantung dan saraf (Banday et al., 2020). Hal ini dapat disebabkan oleh peningkatan inflamasi dan stres oksidatif yang terjadi terus menerus (Reyes-Umpierrez et al., 2017).

Stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia memicu pelepasan mediator pro-inflamasi seperti IL-6 dan TNF- α , serta mengaktifkan jalur biologis yang berkontribusi pada kerusakan sel, termasuk autooksidasi glukosa, jalur poliol, pembentukan AGEs, dan aktivasi Protein Kinase C (Li et al., 2023; Tangvarasittichai, 2015). Dalam jangka panjang, proses ini dapat menyebabkan apoptosis sel β pankreas, yang berpotensi mengakibatkan intoleransi glukosa dan gangguan metabolik lainnya (Montane et al., 2014; Van Greevenbroek et al., 2013). Hiperglikemia kronis juga mengganggu berbagai fungsi biologis, terutama sistem imun seluler. Salah satu mekanisme yang paling terdampak adalah fagositosis, yaitu proses di mana sel imun menghilangkan sel apoptosis atau zat asing berbahaya (Giri et al., 2018). Gangguan aktivitas fagositosis memperburuk inflamasi, menurunkan efektivitas sistem imun, dan meningkatkan risiko penyakit kronis (Antar et al., 2023).

Apoptosis adalah bentuk kematian sel terprogram yang penting untuk menjaga homeostasis seluler dan mendorong regenerasi jaringan (Riwaldt et al., 2021). Sel fagositosis bertugas membersihkan sel apoptosis, sehingga mencegah kerusakan lebih lanjut pada jaringan di sekitarnya (Arandjelovic & Ravichandran, 2015; Rosa et al., 2021). Respon fagositosis yang meningkat dapat membantu mengurangi nekrosis dan mempercepat perbaikan jaringan (Nagata, 2007; Poon et al., 2014). Studi sebelumnya pada model mamalia menunjukkan bahwa diet tinggi gula dapat menurunkan ekspresi reseptor fagositosis, yang berpotensi



akan jaringan (Pavlou et al., 2018). Saat ini, terapi diabetes pada penurunan kadar glukosa darah melalui pemberian obat insulin, dan inhibitor SGLT2 (Weinberg Sibony et al., 2023). terbukti efektif dalam menurunkan hiperglikemia, dampak erti inflamasi kronis dan disfungsi sistem imun, masih kurang. Oleh karena itu, diperlukan eksplorasi pendekatan terapi yang s pada pengaturan kadar glukosa, tetapi juga mengatasi

gangguan sistemik ini, termasuk peran reseptor fagositosis dalam mengeliminasi sel apoptosis dan nekrosis pada hiperglikemia. Pada *Drosophila melanogaster*, reseptor fagositosis seperti Draper memiliki peran penting dalam mengenali dan mengeliminasi sel apoptosis dan nekrosis (Konishi et al., 2022; Li et al., 2015). Berdasarkan temuan ini, peran Draper dalam mengeliminasi sel apoptosis dan nekrosis pada kondisi hiperglikemia dapat diteliti lebih lanjut menggunakan model *D. melanogaster* (Manaka et al., 2004).

Penggunaan *D. melanogaster* telah memberikan pemahaman mengenai cara kerja obat baru, potensi efek toksik yang mungkin muncul sebelum pengujian obat pada manusia secara klinis, dan juga memberikan informasi yang cukup akurat mengenai mekanisme penyakit pada tingkat seluler dan molekuler, serta fenomena apoptosis, nekrosis dan fagositosis (Manaka et al., 2004; Nainu et al., 2015). Dengan tingkat homologi genetik sekitar 75% dengan manusia, *D. melanogaster* menjadi model yang sangat efektif untuk mempelajari jalur dan reseptor yang terlibat dalam pengenalan dan eliminasi sel apoptosis dan nekrosis (Hope & Reiter, 2019; Nainu, 2018).

Berdasarkan latar belakang tersebut, Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki peran sistem imun seluler, dengan fokus khusus pada mekanisme fagositosis pada *D. melanogaster* kondisi hiperglikemia. Secara spesifik, penelitian ini menganalisis fungsi reseptor fagositosis, seperti Draper, dalam mengenali dan membersihkan sel apoptosis dan nekrosis selama hiperglikemia. Dengan memahami peran Draper dalam sistem imun pada kondisi hiperglikemia, diharapkan penelitian ini dapat memberikan wawasan berharga tentang disfungsi imun yang terkait dengan diabetes. Temuan ini juga berpotensi membuka peluang pengembangan strategi terapeutik inovatif, yang tidak hanya menargetkan regulasi kadar glukosa, tetapi juga memperbaiki mekanisme eliminasi sel apoptosis dan perbaikan jaringan melalui modulasi reseptor fagositosis, guna meningkatkan respons imun pada pasien diabetes yang mengalami komplikasi akibat hiperglikemia.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana peran reseptor fagositosis terhadap kondisi hiperglikemia pada organisme model *D. melanogaster*?

1.3 Tujuan Penulisan

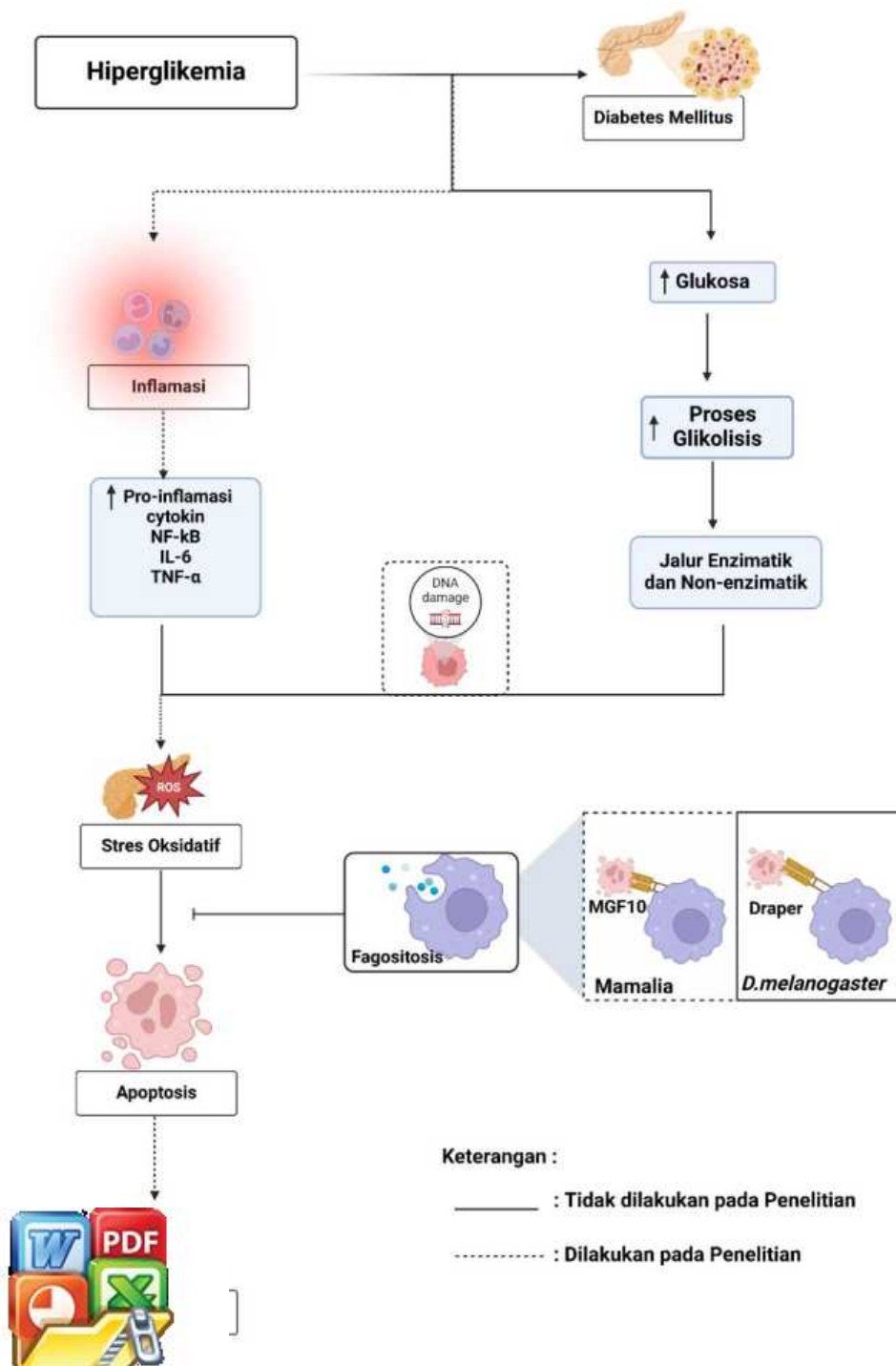
Untuk mengeksplorasi dan mengevaluasi peran reseptor fagositosis terhadap patogenesis penyakit pada model hiperglikemia *D. melanogaster*.

1.4 Manfaat Penelitian



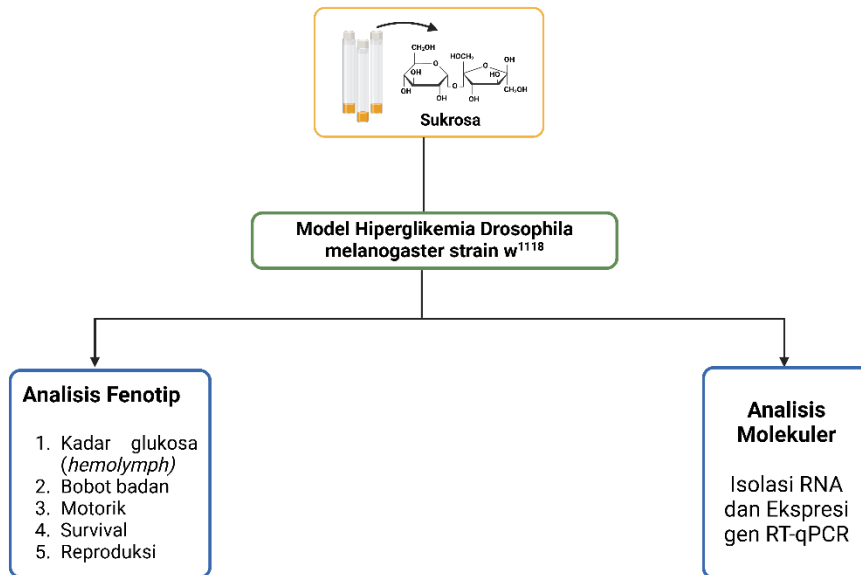
ii diharapkan dapat memberikan informasi dan menjadi dalam pengembangan ilmu pengetahuan di bidang ilmu an *in vivo* khususnya dalam pendekatan target terapi melalui naupun kandidat obat baru yang lebih efektif dalam mengatasi

1.5 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

1.6 Kerangka Konsep



Keterangan :

Variabel Bebas

Variabel Antara

Variabel Terikat

Gambar 2. Kerangka Konsep



Optimized using
trial version
www.balesio.com

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan dan Lokasi Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilaksanakan Laboratorium Farmakologi-Toksikologi dan Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, 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[®]), spektrofotometer (Shimadzu UV-Vis 1800), *centrifuge*, timbangan analitik (Ohaus[®]), tip mikropipet (Gen Follower[®]), vial (Biologix[®]), dan *zoom stereo microscope* (Motic[®]).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *D. melanogaster* jenis *w¹¹¹⁸* (*Laboratory Host Defense and Responses*, Kanazawa University), agar (Swallow[®]), air suling, alkohol 70%, asam propionat, *brewer's yeast*, metil paraben, GOD-PAP (Glory), natrium klorida 0,9%, primer gen (*dilp3*, *dilp6*, *rpr*, *hid*, *grim*, *atg5*, *drpr*, *rp49*), *PureLinkTM RNA Mini Kit* (InvitrogenTM), Universal One-Step RT-qPCR Kit (LunaTM), sukrosa (Smart-Lab[®]), tepung jagung (Mugo[®]) dan treff tube (Treff lab[®]).

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Penyiapan Hewan Coba

Lalat buah *D. melanogaster* yang digunakan yaitu strain *wild type* genotip *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 dengan siklus terang-gelap 12 jam/12 jam. Lalat dipindahkan pada pakan baru setiap 3-5 hari.

2.3.2 Pembuatan Pakan Perlakuan *Drosophila melanogaster*

Pembuatan pakan perlakuan *D. melanogaster* dengan menimbang bahan yang telah disiapkan diantaranya tepung jagung, ragi, agar dan sukrosa. Bahan ditempatkan dalam gelas beaker dan ditambahkan air suling sebanyak 100 mL kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk. Setelah itu, dipanaskan di atas kompor listrik pada suhu 100°C sambil diaduk sampai matang. Setelah matang ditambahkan asam propionat dan metil paraben sebagai pengawet. Komposisi pakan dapat dilihat pada tabel 1.

akan *D. melanogaster*



	Kontrol Normal	Kontrol 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

Asam propionat	400 μ L	400 μ L
Metil paraben	450 μ L	450 μ L
Air mineral	Ad 100 mL	Ad 100 mL

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian pakan diet tinggi gula dengan konsentrasi sukrosa 30% dapat menginduksi hiperglikemia pada *D. melanogaster* (Baenas & Wagner, 2022).

2.3.3 Analisis Fenotip

2.3.3.1 Analisis Kadar Glukosa Hemolymph

Sebanyak 70 larva *D. melanogaster* instar ketiga dikumpulkan untuk ekstraksi hemolimfa guna mengukur konsentrasi glukosa (Liguori et al., 2021). Pengumpulan larva dilakukan pada waktu yang berbeda antara diet normal (DN) dan kelompok DTG karena adanya keterlambatan perkembangan. Larva ditempatkan dalam mikro tabung dan dihomogenisasi menggunakan mikro pastel. Setelah proses homogenisasi, sampel disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 1600 rpm untuk mengekstraksi hemolimfa. Sebanyak 10 μ L hemolimfa dipipet dan dimasukkan ke dalam mikro tabung yang mengandung 1 mL reagen GOD-PAP. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, setelah itu absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corp., Kyoto, Jepang) pada panjang gelombang 500 nm.

2.3.3.2 Penentuan Ukuran dan Bobot

Pengujian ukuran panjang dan bobot badan *D. melanogaster* dilakukan pada larva instar tiga. Larva dicuci menggunakan NaCl untuk menghilangkan sisa makanan kemudian dikeringkan menggunakan kertas penyerap air. Uji bobot badan digunakan satu larva instar tiga pada setiap kelompok untuk mendapatkan bobot rata-rata menggunakan timbangan analitik (Sartorius®) (Lourido et al., 2021) dan ukuran panjang, lebar badan menggunakan jangka sorong digital (Taffware, Indonesia).

2.3.3.3 Analisis merayap dan Lokomotor

Uji merayap (*crawling*) dilakukan dengan mengikuti metode yang dijelaskan sebelumnya (Nichols et al., 2012). Tujuan dari uji ini adalah untuk mengevaluasi dampak dari DTG 30% pada aktivitas motorik larva *D. melanogaster*. Larva instar ketiga dari setiap kelompok perlakuan ditempatkan pada cawan Petri yang berisi agar 2%. Aktivitas merayap 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.

Analisis lokomotor dilakukan pada lalat dewasa yang berhasil menetas dari setiap kelompok perlakuan menggunakan uji *negative geotaxis*. Lalat dimasukkan



motor, kemudian vial diketuk perlahan ke dasar untuk lalat berada pada posisi awal yang seragam. Lalat diketuk al untuk memastikan posisi awal yang seragam. Jumlah lalat ; yang telah ditentukan dalam waktu 15 detik dicatat untuk motor mereka (Linderman et al., 2012).

2.3.3.4 Analisis Survival

Pengujian survival digunakan untuk melihat masa hidup kelompok perlakuan dimulai dari larva instar dua. Sebanyak 20 larva dari setiap kelompok dimasukkan ke dalam vial yang berisi pakan baru yang sesuai dengan pembagian kelompok DN dan DTG 30%. Selanjutnya, dilakukan pencatatan terhadap jumlah larva yang menjadi pupa dan jumlah pupa yang berkembang menjadi lalat dewasa (Asiimwe et al., 2023; Baenas & Wagner, 2022).

2.3.3.5 Analisis Reproduksi

Uji aktivitas reproduksi pada *D. melanogaster* dilakukan menggunakan *pair test assay*. Setelah mencapai usia 5-7 jam sebelum oklusi, sebanyak 20 ekor lalat (10 betina dan 10 jantan) dimasukkan ke dalam vial berisi media pakan sesuai dengan kelompok perlakuan yang ditetapkan. Lalat dipelihara dalam vial selama tiga hari untuk mating, kemudian dikeluarkan. Jumlah pupa yang terbentuk dihitung pada hari kelima sebagai indikator keberhasilan reproduksi (Koliada et al., 2020).

2.3.4 Analisis Secara Molekuler

2.3.4.1 Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan menggunakan PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, U.S.). Sepuluh larva *D. melanogaster* yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube*. Reagen lysis buffer segar disiapkan dengan mencampurkan *2-mercaptoethanol* dengan komposisi 1% dari total volume *lysis buffer*, yaitu 300 µl *lysis buffer* untuk setiap sampel. Campuran tersebut kemudian ditambahkan ke masing-masing tube sampel, dan sampel larva dihancurkan menggunakan *micropestle* sebelum disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Selanjutnya, lisatnya ditransfer ke tube baru, diikuti dengan penambahan etanol 70% sebanyak 300 µl dan pengadukan selama 10 detik. Sampel kemudian ditransfer ke *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 14.000 rpm. Proses ini diulangi sebanyak dua kali.

Setelah dilakukan pengulangan, filtrat dibuang, dan *spin cartridge* dimasukkan kembali ke dalam tabung yang sama. Sebanyak 700 µl larutan Wash Buffer I ditambahkan ke dalam *spin cartridge*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang. Filtrat yang dihasilkan dibuang, dan *spin cartridge* dipindahkan ke *collection tube* yang baru. Kemudian, etanol 96% ditambahkan sebanyak 500 µl, dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang selama 15 detik. Proses tersebut diulangi sebanyak dua kali. Setelah dilakukan proses pengulangan sebanyak dua kali, *spin cartridge* disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, sebanyak 40 µl *RNAse free water* ditambahkan ke bagian tengah *spin cartridge*. Proses tersebut diulang kembali dengan menambahkan *RNAse free*



µl. Kemudian, inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 10 menit. *RNAse free water* ditambahkan sebanyak 40 µl larutan dimasukkan ke dalam *spin cartridge*, kemudian disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Setelah selesai, *spin cartridge* dibuang, dan *collection tube* yang digunakan disimpan pada suhu -80°C.

Ekspresi Gen menggunakan RT-qPCR

Analisis dilakukan pada RNA total yang telah diisolasi menggunakan *reverse transcriptase quantitative PCR* (RT-qPCR) dengan Universal One-

Step RT-qPCR Kit (Luna®, New England Biolabs, Inc., MA, U.S.) sesuai dengan protokol pabrian. Setiap reaksi RT-qPCR dilakukan dalam total volume 10 µL. Reaksi dilakukan menggunakan RotorGeneQ (Qiagen, Jerman), dimulai dengan tahap transkripsi balik pada suhu 37°C selama 15 menit, diikuti dengan 40 siklus amplifikasi PCR. Protokol PCR mencakup denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, dan annealing/elongasi pada suhu 60°C selama 30 detik. Setelah siklus PCR selesai, analisis kurva leleh dilakukan pada suhu 40°C selama 1 menit untuk menilai spesifisitas produk yang diamplifikasi. Urutan primer yang digunakan untuk setiap gen target tercantum dalam Tabel 2.

Table 2. Sekuens primer gen untuk real-time qPCR

Gen	Forward Primers	Reverse Primers
<i>dilp3</i>	ATCCTTATGATCGGCGGTGT	GTTCACGGGGTCCAAAGTTC
<i>dilp6</i>	TGGCGATGTATTTCCCAACAG	CCTTCACTATCCTTTGCAGTACT
<i>atg5</i>	GCACTACATGTCCTGCCTGA	AGATTTCGCAGGGGAATGTTT
<i>Rpr</i>	ACTGGATCCCAATGGCAGTGGCAT TCT	AAAGGATCCTCATTGCGATGGC TTGC
<i>Hid</i>	TGCGAAATACACGGGTTCA	CCAATATCACCCAGTCCCG
<i>Grim</i>	TCGGAGTTTGGATGCTGGGATCTT	AGTCACGTCGTCCTCATCGTTG TT
<i>Drpr</i>	CGGAATTCTCTGCCGCACGGGTT ACATAG	CCGCTCGAGCCGGCTCGAATT TTCGCTT
<i>rp49</i>	CGCTTCAAGGGACAGTATCTG	AAACGCGGTTCTGCATGAG

2.3.5 Analisis statistik

Analisis statistik untuk kadar glukosa hemolimfa, bobot badan, kemampuan crawling larva, lokomotor lalat dewasa, survival dan reproduksi pada *D. melanogaster* dianalisis menggunakan Prism® 9 (GraphPad Software, Boston, U.S.). Data RT-qPCR dianalisis menggunakan perangkat lunak Qgene (Qiagen, Jerman), kemudian dilanjutkan dengan evaluasi statistik menggunakan uji t pada Prism 9.

