

TESIS

STUDI EFEK IMUNOMODULATOR KLOROKUIN MENGGUNAKAN MODEL *Drosophila melanogaster*

STUDY OF THE IMMUNOMODULATOR EFFECTS OF CHLOROQUINE USING THE *Drosophila melanogaster* MODEL



NURDEWI N. BAPULO
P062212033



PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

HALAMAN JUDUL

STUDI EFEK IMUNOMODULATOR KLOROKUIN MENGGUNAKAN MODEL *Drosophila melanogaster*

NURDEWI N. BAPULO
Nomor Induk Mahasiswa P062212033



PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

HALAMAN PENGAJUAN

STUDI EFEK IMUNOMODULATOR KLOROKUIN MENGGUNAKAN MODEL *Drosophila melanogaster*.

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

NURDEWI N. BAPULO

Nomor Induk Mahasiswa P062212033

Kepada

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

STUDI EFEK IMUNOMODULATOR KLOROKUIN MENGGUNAKAN MODEL *Drosophila melanogaster*

NURDEWI N. BAPULO

Nomor Induk Mahasiswa P062212033

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
pada tanggal 28 Februari 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt
NIP. 19560114 198601 2 001

Pembimbing Pendamping,

Prof. Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt
NIP. 19820610 200801 1 012

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik

Prof. dr. Rahmawati Minhajat., Ph.D. Sp.PD. K-HOM. FINASIM
NIP. 19680218 199903 2 002



Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin,

Prof. dr. Budri, Ph.D. Sp.M(K).M.Med.Ed
NIP. 19661231 199503 1 009

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "STUDI EFEK IMUNOMODULATOR KLOROKUIN MENGGUNAKAN MODEL *Drosophila melanogaster*" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Prof. Dr. Elly Wahyudin.DEA.Apt dan Prof. Firzan Nainu.,M.Biomed.,Sc.Ph.D.Apt). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal (ACS OMEGA) sebagai artikel dengan judul "Pharmacological activities of chloroquine on the innate immune system of *Drosophila melanogaster*". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 28 Februari 2024



UCAPAN TERIMAKASIH

Bismillahirrahmanirrahim,

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh. Ucapan syukur penulis ucapkan kepada Allah Subhana Wata'ala atas kelancaran penelitian sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "Studi efek klorokuin menggunakan model *Drosophila melanogaster*". Penulis menyampaikan terima kasih secara khusus kepada:

1. **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.** selaku rektor Universitas Hasanuddin atas fasilitas yang diberikan untuk mendukung proses akademik selama pendidikan di Program Magister di Universitas Hasanuddin
2. **Prof. dr. Budu, Ph.D,Sp.M(K), M.MedEd** selaku dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin beserta staf program Pascasarjana yang telah memberikan bantuan dalam proses penyelesaian tesis ini.
3. **Prof. Dr. Elly Wahyudin.DEA.Apt** selaku pembimbing utama yang telah banyak berkontribusi dalam proses penyusunan tesis serta dengan sabar membimbing penulis dari proses perencanaan penulisan hingga selesai.
4. **Prof. Firzan Nainu.,M.Biomed.,Sc.Ph.D.Apt** selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan untuk mendukung jalannya penelitian dan penyusunan tesis ini
5. **Prof. dr, Peter Kabo.,Ph.D.,Sp.PK, dr, Yenni Yusuf.,MinfectDis., dan Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes.,** sebagai tim penguji tesis yang banyak memberi masukan dan arahan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis.
6. Teman-teman penelitian **UFRG** Universitas Hasanuddin Makassar, atas kerjasamanya serta bantuan semasa penelitian.
7. Teman-teman seperjuangan prodi Ilmu Biomedik Konsentrasi Farmakologi, atas bantuan selama proses perkuliahan.

Akhirnya, penghargaan dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua saya tercinta, Ayahanda **Nuh Nasir**, Ibunda **Ramla Jalal** serta kakak **Dewista N. Bapulo**, dan adik-adik **Abdul Mahdi N. Bapulo, Rahmat N. Bapulo** dan **Nasrullah N. Bapulo** atas doa, pengorbanan, banyak cinta dan kasih sayang, kesabaran, serta memberikan dukungan yang luar biasa baik berupa semangat maupun materi selama ini. Akhir kata, perkenankan penulis menyampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas segala kesalahan dan kekhilafan baik yang disengaja maupun tidak disengaja selama proses menjalani pendidikan hingga terselesaikannya tesis ini. Penulis berharap karya akhir ini dapat memberikan manfaat serta pengetahuan di bidang ilmu biomedik di masa yang akan datang. Wassalamu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh.

Penulis,

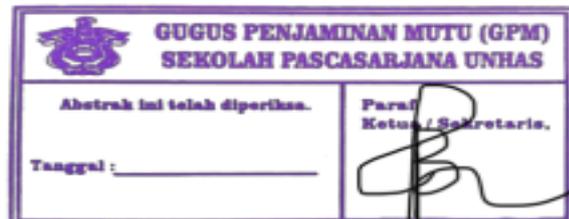
Nurdewi N. Bapulo

ABSTRAK

NURDEWI N. BAPULO. *Studi Efek Imunomodulator Klorokuin Menggunakan Model *Drosophila melanogaster* (dibimbing oleh Elly Wahyudin dan Firzan Nainu).*

Dalam beberapa tahun terakhir, utamanya di era Covid-19 klorokuin digunakan dalam pengobatan autoimun. Klorokuin telah dikenal luas sebagai obat antimalaria, namun senyawa ini kembali menjadi sorotan karena potensinya dalam memodulasi respon kekebalan tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk menggali lebih dalam mengenai hubungan yang kompleks antara klorokuin dan sistem kekebalan tubuh, dengan memahami kemungkinan pengaruh senyawa ini terhadap jalur aktivasi sistem imun alamiah pada *Drosophila melanogaster*. Penelitian ini dibagi menjadi 6 tahap, yakni: 1) penyiapan sampel; 2) penyiapan hewan uji *D. melanogaster* jenis *PGRP-LB^Δ*; 3) pembuatan 3 pakan perlakuan dengan varian konsentrasi klorokuin 0,001 mM, 0,01 mM, dan 0,1 mM; 4) pengujian survival; 5) analisis molekuler gen-gen terkait sistem imun yaitu Dipterin (*dpt*), CecropinA1 (*CecA1*), dan Turandot A (*totA*) menggunakan metode *reverse transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*; dan 6) analisis data menggunakan *Graphpad Prism^{®9}*. Hasil penelitian menunjukkan pemberian klorokuin, seiring dengan meningkatnya konsentrasi berdampak negatif terhadap kelangsungan hidup *Drosophila*. Hal ini mungkin dapat dikaitkan dengan peningkatan secara molekuler ekspresi gen pada jalur aktivasi sistem imun *Nuclear Factor KB* (NF-KB) khususnya pada *CecA1*, namun tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap ekspresi *dpt* dan pada jalur JAK-STAT melalui ekspresi *totA*. Sebagai kesimpulan, klorokuin pada mutan *Drosophila* jenis *PGRP-LB^Δ* memperlihatkan efek stimulasi sistem imun pada jalur NF-KB namun tidak pada jalur JAK-STAT.

Kata kunci : Klorokuin, *PGRP-LB^Δ*, sistem imun alamiah, *dpt*, *cecA1*, *totA*.

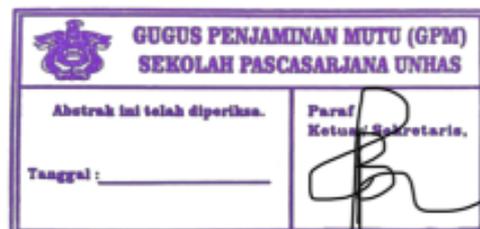


ABSTRACT

NURDEWI N. BAPULO. *Study of Immunomodulatory Effects of Chloroquine Using *Drosophila melanogaster* Model* (supervised by **Elly Wahyudin** and **Firzan Nainu**).

In recent years, especially in the era of COVID-19, chloroquine has been used in the treatment of autoimmune diseases. Chloroquine is widely known as an antimalarial drug, but this compound has regained attention due to its potential to modulate the immune response. This research aims to delve deeper into the complex relationship between chloroquine and the immune system by understanding its possible effects on the natural immune activation pathways in *Drosophila melanogaster*. The study is divided into 6 stages: 1) sample preparation; 2) preparation of the test organism *D. melanogaster* type *PGRP-LB^A*; 3) preparation of 3 treatment feeds with concentration variants of 0.001 mM, 0.01 mM, and 0.1 mM; 4) survival testing; 5) molecular analysis of immune system-related genes, namely Dipteracin (*dpt*), CecropinA1 (*CecA1*), and Turandot A (*totA*), using *reverse transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR); and 6) data analysis using *Graphpad Prism^{®9}*. The results of the study show that the administration of chloroquine, along with increasing concentrations, has a negative impact on the survival of *Drosophila*. This may be associated with a molecular increase in gene expression in the Nuclear Factor KB (NF-KB) immune system activation pathway, especially in *CecA1*, but does not show a significant effect on *dpt* expression and the JAK-STAT pathway through *totA* expression. In conclusion, chloroquine in the mutant *Drosophila* type *PGRP-LB^A* exhibits a stimulating effect on the NF-KB immune pathway but not on the JAK-STAT pathway.

Keywords: *Chloroquine, PGRP-LB^A, natural immune system, dpt, cecA1, totA.*



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
LEMBAR PENGESAHAN TESIS	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN	Error! Bookmark not defined.
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	1
1.3 Tujuan Penelitian	1
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB II METODE PENELITIAN	4
2.1 Rancangan dan lokasi penelitian	4
2.2 Alat dan Bahan	4
2.2.1 Alat	4
2.2.2 Bahan	4
2.3 Metode Penelitian	4
2.3.1 Penyiapan hewan uji	4
2.3.2 Penyiapan pakan <i>Drosophila melanogaster</i>	4
2.3.3 Pembuatan sampel	4
2.3.4 Pembuatan Heat Killed E.Coli	5
2.3.5 Uji Survival	5
2.3.6 Penyiapan sampel RNA	5
2.3.7 Analisis ekspresi gen	5
2.3.8 Analisis data	6
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	7
3.1 Hasil	7
3.1.1 Klorokuin mempengaruhi kelangsungan hidup <i>PGRP-LB^A</i>	7

3.2 Pembahasan.....	9
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	11
4.1 Kesimpulan	11
4.2 Saran.....	11
DAFTAR PUSTAKA	12
LAMPIRAN	14

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Sekuens primer gen.....	6
---	---

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Teori.....	2
Gambar 2. Kerangka Konsep	2
Gambar 3. Peningkatan kemampuan bertahan hidup larva PGRP-LBΔ setelah pemberian klorokuin pada beberapa variasi konsentrasi. * p < 0.05; ** p < 0.01; dan **** p < 0.0001 (Setiap perlakuan dibandingkan terhadap Heat-killed E. coli sebagai kontrol).....	7
Gambar 4. Paparan HKE menginduksi gen sistem imun larva PGRP-LBΔ (A – C) Kombinasi dengan klorokuin meningkatkan ekspresi dpt pada konsentrasi 0,1 mM (D meningkatkan ekspresi cecA1 (E) dan menekan ekspresi totA pada semua variasi konsentrasi (F). NS (non signif)	8

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja penelitian	14
Lampiran 2. analisis survival oneway anova	15
Lampiran 3. Tabel analisis ekspresi gen dpt oneway anova.....	15
Lampiran 4. analisis ekspresi gen cecA1 oneway anova.....	15
Lampiran 5. analisis ekspresi gen totA oneway anova.....	16

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Keterangan
µl	Mikroliter
mM	Milimolaritas
g	Gram
ml	Mililiter
mg	Miligram
dpt	Diptericin
cecA1	CecropinA1
totA	Turandot A
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
IMD	<i>Immune deficiency</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
AMP	<i>Antimicrobial peptide</i>
COVID-19	<i>Corona virus disease 19</i>
ROI	<i>Reactive oxygen intermediate</i>
RNI	Reactive nitrogen intermediate
NO	<i>Nitric oxide</i>
LBB	<i>Luria bertani broth</i>
NA	<i>Natrium Agar</i>
KTP	<i>Kontrol tanpa perlakuan</i>
JAK-STAT	<i>Janus Tyrosine Kinase-Signal Transducers and Activator of Transcription</i>
HKE	<i>Heat Killed E.Coli</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGRP-LB	<i>Peptidoglycan Recognition Protein LB</i>
Rp49	Ribosomal Protein 49
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sistem kekebalan tubuh diperlukan untuk melawan infeksi patogen yang berbahaya. Berkaitan dengan fungsinya sebagai pertahanan tubuh terhadap penyakit, modulasi sistem imun memegang peranan penting dalam mengatur aktivitasnya. Modulasi ini berperan untuk menjaga aktivitas sistem imun agar tetap dalam kondisi homeostasis (Strzelec *et.al.*,2023). Telah diketahui sebelumnya, adanya respon sistem imun yang berlebih dapat memicu penyakit-penyakit autoimun, beberapa diantaranya seperti lupus, arthritis reumatoid, dan diabetes tipe I. Kondisi ini menggambarkan bagaimana sistem imun dapat membahayakan dan merusak tubuh karena tidak dapat membedakan sel normal dan benda asing (Smith.,1999). Sebaliknya, respon imun yang sangat rendah, justru akan menyebabkan tubuh lebih rentan terhadap infeksi (Justiz & Qurie., 2023). Kondisi ini juga berbahaya jika tidak ditangani segera. Salah satu solusi yang ditawarkan untuk menangani masalah-masalah tersebut adalah penggunaan senyawa atau obat yang berefek sebagai imunomodulator.

Imunomodulator dikenal sebagai senyawa yang bekerja dalam regulasi imunitas dengan cara mengurangi atau meningkatkan respon imun. Senyawa yang berfungsi dalam menurunkan aktivitas sistem imun disebut immunosupresan, sedangkan yang berfungsi dalam peningkatan respon imunitas disebut imunostimulan (Ceyda.,2022). Beberapa senyawa maupun obat telah diketahui memiliki efek sebagai imunomodulator, salah satunya adalah klorokuin. Belakangan ini, klorokuin mendapat banyak perhatian karena dianggap memiliki potensi yang menjanjikan dalam penanganan COVID-19 (Cortegiani *et al.*,2020). Klorokuin, yang merupakan turunan quinine, telah digunakan selama bertahun-tahun sebagai anti-malaria (Torsten *et al.*,2006). Telah dilaporkan sebelumnya bahwa klorokuin memiliki aktifitas antiinflamasi dan imunomodulator yang bertanggung jawab dalam mengatur respon imunitas tubuh (Schrezenmeier & Dörner.,2020). Berbagai penelitian telah memperlihatkan aktivitas klorokuin sebagai imunomodulator, namun ketersediaan informasi dalam menjelaskan efek ini secara molekuler masih belum memadai. Oleh karena itu, untuk memperoleh informasi aktivitas klorokuin yang lebih komperhensif, dibutuhkan organisme model *in vivo* yang mampu menggambarkan efek senyawa, baik secara fenotipe maupun molekuler.

Sebagai organisme model, lalat buah (*Drosophila melanogaster*) memiliki banyak keuntungan untuk digunakan sebagai sistem *in vivo* dalam skrining obat yang berkaitan dengan kekebalan tubuh. Seperti halnya kebanyakan serangga, *Drosophila melanogaster* memiliki sistem imunitas alamiah namun tidak dilengkapi dengan sistem imun adaptif (Hoffmann.,2003) sehingga, penggunaan model ini dalam penelitian imunitas mampu memberikan pemahaman secara sederhana dan mendalam melalui mekanisme imunitas alamiah. Selain memiliki kemiripan materi genetik dengan manusia sebesar 60% (Ugur *et al.*,2016), menurut Nainu *et al* (2019), dalam penelitian terkait imunologi, tersedianya galur mutan dan transgenik pada model ini, dapat digunakan sebagai model inflamasi kronik maupun imunodefisiensi yang tidak memiliki fenotip imun tertentu. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas imunomodulator klorokuin menggunakan organisme model *Drosophila melanogaster* jenis mutan *PGRP-LB^A* yang dapat dilihat dari profil fenotip (masa hidup) dan genotip (ekspresi gen terkait sistem imun jalur Imd dan JAK/STAT) yang terdapat pada *Drosophila melanogaster*.

1.2 Perumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana efek imunomodulator dari klorokuin terhadap model *D. melanogaster*.

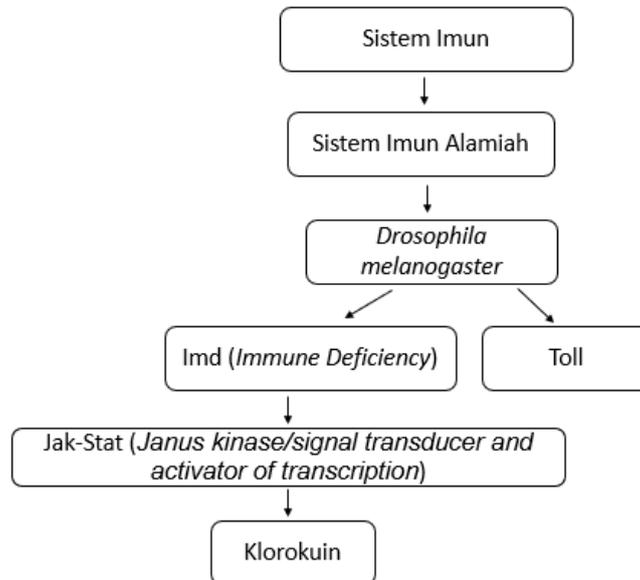
1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas imunomodulator yang terdapat di dalam klorokuin dengan menggunakan *D. melanogaster*.

1.4 Manfaat Penelitian

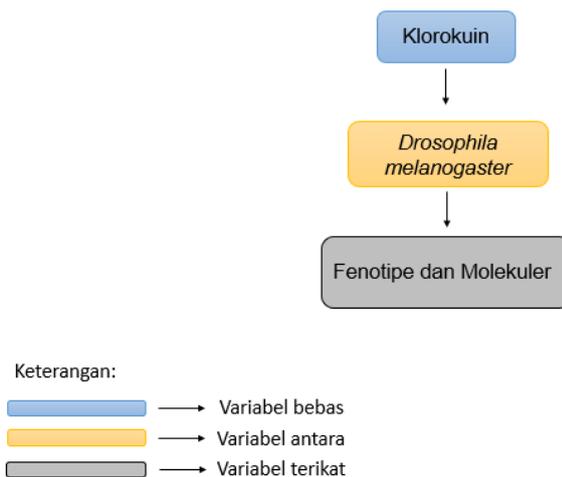
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi aktivitas imunomodulator yang terdapat di dalam klorokuin dengan menggunakan *D. melanogaster* pada sistem imun alamiah.

1.5 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

1.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep

1.7 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu pemberian klorokuin sebagai imunomodulator dapat memperbaiki aktivitas sistem imun pada *Drosophila melanogaster* mutan PGRP-LB^A.